

Biokatalyse an hydrophoben Substraten mit Tensiden und Membranen als reaktionstechnische Werkzeuge

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur

Bernhard Orlich

aus Berlin

Vom Fachbereich 5 -Chemie-
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

Dr. - Ing.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender:	Prof. Dr. G. Findenegg
Berichter:	Prof. Dr. R. Schomäcker
Berichter:	Prof. Dr. J. Starnick

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2000

Berlin 2000

D83

Abstract

Orlich, Bernhard:

Biokatalyse an hydrophoben Substraten mit Tensiden und
Membranen als reaktionstechnische Werkzeuge

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Enzym-Membran-Verbundsysteme untersucht, welche die Enzymkatalyse zur Darstellung hydrophober sekundärer Alkohole ermöglichen: Ein Enzym-Membran-Konzept mit der Verwendung von w/o-Mikroemulsionen als Reaktionsmedium und eine Reaktivmembran.

Bei wasserunlöslichen Substraten kann durch die Verwendung von Mikroemulsionen als Reaktionsmedien die Reaktionslimitierung wegen der geringen Löslichkeit umgangen werden. Die Enzymimmobilisierung von Lipasen oder Oxidoreduktasen und die Produktisolierung kann in einem kontinuierlich betriebenen Prozeß mittels einer Ultrafiltration erfolgen.

Da die Darstellung chiraler Alkohole durch Alkoholdehydrogenase als Biokatalysator nur in Verbindung mit Cofaktoren (NADH) erfolgt, muß dieser aus Kostengründen mittels eines zweiten Enzyms, Formiatdehydrogenase, regeneriert werden. Der hydrophile Cofaktor NADH ist vollständig in den inversen Mizellen der Mikroemulsionen solubilisiert und wird ebenso durch die Ultrafiltration immobilisiert. Als Beispielsubstrate wurden bei der Verwendung von verschiedenen Alkoholdehydrogenasen sekundäre hydrophobe Ketone reduziert, im Falle der Lipase die Veresterungsreaktion von Menthol untersucht.

Die Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchungen von *Yeast* Alkoholdehydrogenase, Carbonylreductase aus *Candida Parapsilosis* und *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Mikroemulsionen ergaben hohe Stabilitäten in w/o-Mikroemulsionen bestimmter Zusammensetzungen. So konnte für die *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase kein Aktivitätsverlust auch nach mehreren Monaten detektiert werden. Auf der Basis einer photometrischen pH-Wert-Messung durch Bromkresolpurpur konnte daher die Reduktion verschiedener Ketone in Mikroemulsionen durchgeführt werden. Die Reduktion von Aceton durch *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase konnte mit den höchsten Umsätzen und einer hohen Zyklenzahl (>2000) durchgeführt werden. Auf der Basis kinetischer Untersuchungen des Reaktionssystems zur Reduktion von 2-Butanon mit *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase und Carbonylreductase aus *Candida Parapsilosis* wurden Feed-Batch Versuche bis zu einem vollständigen Umsatz durchgeführt. Ebenso konnte die Mentholveresterung durch *Candida Rugosa* Lipase in Feed-Batch Versuchen mit einem absoluten Enantiomerenüberschuß bei relativ hohen Umsätzen (bis 25 %) durchgeführt werden. Im Projekt über die Reaktivmembran gelang auf der Basis der Synthese und Charakterisierung von Poly (vinylalkohol)-Membranen die Darstellung des katalytisch aktiven Enzym-Membran-Verbundes durch kovalente Anbindung von *Candida Rugosa* Lipase. Bei der Hydrolyse von p-Nitrophenyllaurat in Abhängigkeit von der Kontaktzeit mit dem Membranverbund wurde ein hoher Umsatz bei einer langen Kontaktzeit von Enzym und Substrat (niedriger Volumenfluß durch die Membran) festgestellt. Die enantioselektive Mentholesterhydrolyse in o/w-Mikroemulsionen gelang mit hohen Enantiomerenausbeuten (ee >80 % auch bei Umsätzen über 25 %) sowohl mit freier Lipase als auch mit dem Enzym-Membran-Verbund. Der Enzym-Membran-Verbund zeichnete sich durch eine hohe Stabilität (Enzymaktivität auch nach einigen Wochen Standzeit) sowie ein hohen Enzymausbeutefaktor während der Immobilisierung aus.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Herbst 1997 bis Herbst 2000 im Institut für Technische Chemie der Technischen Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhard Schomäcker angefertigt.

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Schomäcker, meinem Doktorvater, für die interessante Themenstellung, der Bereitstellung der Arbeitsmittel und seiner steten Bereitschaft Probleme, in dieser für mich lehrreichen Zeit, zu diskutieren. Seine positive Sicht der Dinge hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
- Herrn Prof. Dr. Starnick für die freundliche Übernahme des Koreferates.
- Den Mitarbeitern des Institutes für Biotechnologie 2 des Forschungszentrum Jülich, Prof. C. Wandrey, Prof. U. Kragl (jetzt Universität Rostock) und Dr. S. Rissom (jetzt Aventis AG) für die freundliche Überlassung vieler Units FDH und CPCR. Speziell Herrn Dr. Andreas Liese vom FZ - Jülich für vielseitige Hilfestellungen in Form von Enzymen, Druckschriften und Diskussionen gebührt hier besonderer Dank.
- Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Schomäcker für interessante Diskussionen, viele Hilfestellungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Speziell den Diplomanden, Studienarbeitern und Auszubildenden, welche die praktischen Arbeiten tatkräftig unterstützt haben, gilt mein Dank. Dr. Oliver Brüggemann rechne ich die kritische Durchsicht dieser Arbeit hoch an.
- Herrn Winter sowie Frau Lorentz danke ich für viele Hilfestellungen im Labor.
- Allen Mitarbeitern der Werkstätten des Instituts für Technischen Chemie (Elektro-, Mechanik-, Glaswerkstatt) gilt mein Dank für diverse Anfertigungsarbeiten von Apparaturen.
- Herrn Schmidt, Frau Prochnow und Herrn Fiedler von der Fraunhofer Gesellschaft IZM Berlin für die Hilfe bei der Anfertigung von Schliffbildern und die interessanten Diskussionen.
- Prof. Dr. Reichert und den Mitarbeitern des Teilprojektes A7 im Sonderforschungsbereich 448 für viele interessante Diskussionen. U. Mähr, A. Beyer und E. Kempin danke ich für die gute Teamarbeit. Ebenso danke ich den Kooperationspartnern aus dem TP B5 (Jörg Barner), B6 (Henry Bock), A4 (Daniela Fliegner), und A6 (Ulrich Menge & Tobias Fütterer) für zahlreiche Hilfestellungen.
- Meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion: Micha, Daniel, Gideon, Katharina und Gina seien hier stellvertretend genannt.
- Meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums so wie ihr Interesse an meiner Arbeit.
- Meiner Lebensgefährtin Christiane Juber für den steten Rückhalt, ihr Interesse an meiner Arbeit und die erfreuliche Ablenkung in meiner freien Zeit.

Private Gefühle versus öffentliche Stellungnahmen

[...]Unsystematische, plötzliche Einfälle und persönliche, ja gefühlsgeladene Reaktionen sind Dinge, die in der Wissenschaft angeblich nichts zu suchen haben. In Wahrheit, so scheint mir, sind sie genau das, womit wir in der Forschung alle arbeiten. In Fachbeiträgen hüllen wir unsere Ideen in phantasievolle, frisch gestärkte Kleider und geben vor, alles sei streng wissenschaftlich, aber im Grunde, hinter den Kulissen, sind 90 Prozent davon spontane Eingebung.

Genauer gesagt: Mißt man einen Aufsatz oder ein Buch unserer Fachrichtungen an seinen eigenen Voraussetzungen, läßt man sich also bewußt auf seinen unausgesprochenen Bezugsrahmen ein (was einem meistens gar nicht bewußt wird), so findet man das Geschriebene in aller Regel gut begründet und stimmig und daher ziemlich überzeugend. [...] Aber die Autoren selber sehen die vielen stillschweigenden Vorgaben ihrer Wissenschaft nur selten, und schon gar nicht wollen sie darauf aufmerksam machen. Auch andere machen überraschend selten darauf aufmerksam - einfach weil derlei Dinge nicht nur schwer wahrnehmbar, sondern auch schwer formulierbar sind. Damit würde man sich ja nur eine unangenehme Debatte über alle möglichen, schwammigen ungreifbaren Probleme einhandeln. Und doch sind es gerade diese unsichtbaren, nicht erwähnten Probleme, die von tief unten auf jedes Forschungsprojekt Einfluß nehmen.

Der Mathematiker Douglas R. Hofstadter und die *Fluid Analogies Research Group* in "Die FARGonauten - Über Analogie und Kreativität" (Klett-Cotta 1996)

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Historie der Biokatalyse in ungewöhnlichen Reaktionsmedien	11
1.2 Immobilisierung von Biokatalysatoren	13
1.3 Katalytisch aktive Membranen	14
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung	18
3 Enzym–Membran–Konzept bei Verwendung von w/o–Mikroemulsionen	20
3.1 Enzymkatalysierte Reaktionen in w/o–Mikroemulsionen	20
3.1.1 Mikroemulsionen	20
3.1.2 Enzymkatalyse in Mikroemulsionen	25
3.1.3 Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen	31
3.1.4 Enzymstabilität und Produktausbeute	37
3.1.5 Alternativen zur Enzymkatalyse in w/o-Mikroemulsion	41
3.2 Reaktionen im Enzym–Membran–Reaktor bei Verwendung von Mikroemulsionen	47
3.2.1 Reduktion prochiraler Ketone	47
3.2.2 Racemattrennung mittels Lipase	68
3.3 Die Ultrafiltration tensidhaltiger Reaktionslösungen	78
3.3.1 Der Volumenfluß und Rückhalt bei der UF wäßriger Tensidlösungen	81
3.3.2 Der Volumenfluß und Rückhalt bei der UF von Mikroemulsionen	82
3.3.3 Modellbeschreibung der Ultrafiltration von Mikroemulsionen	83
3.3.4 Der Rückhalt bei der UF von Reaktionskomponenten in Mikroemulsionen	88
4 Reaktivmembranen	92
4.1 Polyvinylalkohol als Membranwerkstoff	92
4.2 Immobilisierung von Lipase aus <i>Candida Rugosa</i> an PVA–Membranen	98
4.3 Reaktionen der <i>Candida Rugosa</i> Lipase immobilisiert auf einer PVA–Membran	100
5 Diskussion und Ausblick	107
6 Zusammenfassung	110
7 Material und Methoden	112
8 Literatur	126

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Strukturen von Thalidomiden (Contergan) und Asparagin	11
Abb. 1.2:	Möglichkeiten zur Enzymkatalyse mit hydrophoben Substraten	12
Abb. 1.3:	Immobilisierungsarten von Enzymen	13
Abb. 1.4:	Verschiedene Filtrationsarten nach der Größe der abzutrennenden Substanz	14
Abb. 3.1:	a) Schematische Darstellung eines Phasenprismas; b) Phasendreieck von Igepal CA520/ n-Heptan / Wasser	20
Abb. 3.2:	a) Schematische Darstellung der Strukturen im Einphasenkanal; b) Ölreiche Seite des Einphasenkanals bei Verwendung verschiedener Tenside	21
Abb. 3.3:	Reaktionen in Mikroemulsionen	24
Abb. 3.4:	Ölreiche Ecke des Gibbs'schen Phasendiagramms Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser	29
Abb. 3.5:	Mögliche Formen des Phasentransferprozesses	30
Abb. 3.6:	Schematisches Bild einer inversen Mizelle mit unterschiedlichen Wasserbereichen	34
Abb. 3.7:	Relative Aktivität von <i>Candida Rugosa</i> Lipase; Aktivität von Formiatdehydrogenase in Abhängigkeit vom w_1 – Wert	35
Abb. 3.8:	Produktspezifische Cofaktor-Kosten in Abhängigkeit von der Zyklenzahl	40
Abb. 3.9:	Ölreiche Ecke des Gibbs'schen Phasendiagramms Tween 85 / Cyclohexan / Wasser bei 37°C	45
Abb. 3.10:	a) Berechnete Hefe-Trockenmasse in einer Mikroemulsion; b) Mikroskopische Aufnahme der Hefeaggregation in der Mikroemulsion	46
Abb. 3.11:	Das schematische Reaktionssystem der Reduktion von Ketonen mit einer Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung in einer Mikroemulsion	49
Abb. 3.12:	pH – Abhängigkeit von FDH in Wasser und einer w/o-Mikroemulsion	50
Abb. 3.13:	NAD^+ - Abhängigkeit der FDH in Wasser und einer Mikroemulsion	51
Abb. 3.14:	Formiat - Abhängigkeit der FDH in Wasser und einer Mikroemulsion	51
Abb. 3.15:	Temperaturabhängigkeit und pH – Abhängigkeit von YADH	52
Abb. 3.16:	Kinetik der YADH bei der Reduktion von 2-Heptanon in Wasser und einer Mikroemulsion	53
Abb. 3.17:	Stabilität der YADH in Mikroemulsionen	54
Abb. 3.18:	a) Ölreiche Ecke des Gibbs-dreiecks Tween 85 / Cyclohexan / Wasser b) Desaktivierung von <i>CPCR</i> in einer Mikroemulsion	56
Abb. 3.19:	<i>CPCR</i> katalysierte Reduktion von 2-Butanon in Abhängigkeit von den Mikroemulsionszusammensetzungen	57
Abb. 3.20:	Dichte von w/o-Mikroemulsionen	59
Abb. 3.21:	Aktivität von <i>CPCR</i> und relative dynamische Viskosität der Mikroemulsion	59
Abb. 3.22:	Desaktivierung von <i>CPCR</i> in einer Mikroemulsion	61
Abb. 3.23:	a) Absorption von Bromthymolblau in Wasser und einer Mikroemulsion; b) Absorption von Bromkresolpurpur in Wasser und einer Mikroemulsion	62
Abb. 3.24:	Formiatverbrauch bei der Reduktion von 2-Butanon (<i>CPCR</i>)	63
Abb. 3.25:	<i>HLADH</i> katalysierte Reduktion von 2-Butanon in Abhängigkeit von den Mikroemulsionszusammensetzungen	64
Abb. 3.26:	Aktivität von <i>HLADH</i> und relative dynamische Viskosität der Mikroemulsion	65
Abb. 3.27:	Desaktivierung von <i>HLADH</i> in einer Mikroemulsion	66
Abb. 3.28:	Reduktion von Aceton in einer Mikroemulsion	67

Abb. 3.29:	Formiatverbrauch bei der Reduktion von 2-Butanon (<i>HLADH</i>)	68
Abb. 3.30:	Bindung eines Esters im aktiven Zentrum von Lipasen	70
Abb. 3.31:	Reaktionsschema der CRL-katalysierten p-Nitrophenyllaurat-Hydrolyse	72
Abb. 3.32:	Relative Aktivität von CRL in Abhängigkeit vom pH-Wert (rechts) und der Temperatur (links) in einer Mikroemulsion	73
Abb. 3.33:	a) Extinktionskoeffizient von PNP bei verschiedenen Wassergehalten in einer Mikroemulsion; b) Detektion des Umschlagpunktes von PNP in Wasser und einer Mikroemulsion	74
Abb. 3.34:	Desaktivierung von CRL (links) und Konzentrationsabhängigkeit der PNPL – Hydrolyse (rechts)	75
Abb. 3.35:	Reaktionsschema der enantioselektiven Veresterung von Menthol in einer w/o-Mikroemulsion	76
Abb. 3.36:	Veresterung von rac. Menthol mit Propionsäureanhydrid	76
Abb. 3.37:	Umsatz der CRL-katalysierten Veresterung von rac. Menthol mit Propionsäureanhydrid in einer Mikroemulsion	77
Abb. 3.38:	AFM einer auf Cyclohexan konditionierten BM100	79
Abb. 3.39:	Permeatfluß bei der Filtration wäßriger Tensidlösungen durch verschiedene Membranen mit Konzentrationen unterhalb der cmc	82
Abb. 3.40:	a) Rückhalt von abgetopptem Marlipal O13-60 in einer Mikroemulsion; b) Volumenfluß bei der Filtration von Mikroemulsionen	83
Abb. 3.41:	Schematische Darstellung des Konzentrationsprofils an einer Membran; Auswertung des Grenzflusses bei der Filtration von Mikroemulsionen	85
Abb. 3.42:	Schematische Darstellung des Modells des Kräftegleichgewichtes	86
Abb. 3.43:	Berechnetes Konzentrationsprofil des Tensides im Abstand zur Membran	87
Abb. 3.44:	Rückhalt verschiedener Reaktionskomponenten bei der Filtration einer Mikroemulsion	89
Abb. 3.45:	Rückhalt von Propionsäureanhydrid bei der Filtration einer Mikroemulsion	91
Abb. 4.1:	Allgemeine Strukturformel von PVA	93
Abb. 4.2:	Anriß einer Membran und Querschliff durch eine PVA-Membran	95
Abb. 4.3:	Volumenfluß in Abhängigkeit vom angelegten Transmembrandruck	95
Abb. 4.4:	Säurekatalysierte Vernetzungsreaktion von PVA mit Glutardialdehyd	96
Abb. 4.5:	Kovalente Enzymenbindung eines Enzyms an ein PVA-Membran	99
Abb. 4.6:	Schematische Darstellung einer porösen Reaktivmembran	101
Abb. 4.7:	Darstellung verschiedener berechneter Thiele Module über die dimensionslose Länge einer beliebigen Reaktivmembran	101
Abb. 4.8:	Ausbeutefaktor der CRL Immobilisierung; Aktivität der CRL zu verschiedenen Zeitpunkten während der Filtration	103
Abb. 4.9:	Umsatz der p-Nitrophenyllaurat-Hydrolyse mit membrangebundener CRL	104
Abb. 4.10:	Umsatz und enantiomerenüberschuß der Propionsäurementhylesterhydrolysedurch freie CR-Lipase in einer o/w-Mikroemulsion	104
Abb. 4.11:	Umsatz und enantiomerenüberschuß der Propionsäurementhylesterhydrolyse durch membrangebundene CRL bei Verwendung einer o/w-Mikroemulsion	106
Abb. 7.1:	Elutionsprofil des Säulenlaufs	115
Abb. 7.2:	Fließschema des Enzym-Membran-Reaktors	116
Abb. 7.3:	Photographie der verwendeten Filtrationsapparatur	118
Abb. 7.4:	Reaktionsschema der zufällig bireaktanden Reaktion	124

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Anwendungen der Membrantechnik	15
Tab. 1.2:	Charakterisierung eines Membran-Enzym-Verbundes	17
Tab. 3.1:	Einfluß verschiedener Faktoren auf die Krümmung des Tensidfilmes	24
Tab. 3.2:	Enzymkatalysierte Reaktionen in w/o-Mikroemulsionen	27
Tab. 3.3:	Einflußgrößen der Denaturierung von Enzymen	38
Tab. 3.4:	Die kinetischen Parameter der FDH katalysierten Cofaktor-regenerierung	51
Tab. 3.5:	Die kinetischen Parameter der YADH in Wasser und einer w/o-Mikroemulsion	53
Tab. 3.6:	Desaktivierung der FDH und YADH	55
Tab. 3.7:	Kinetische Daten der <i>CPCR</i>	62
Tab. 3.8:	Kinetische Daten der <i>HLADH</i>	66
Tab. 3.9:	<i>Candida Rugosa</i> Lipase in ungewöhnlichen Reaktionsmedien	71
Tab. 3.10:	Auszug von Herstellern kommerzieller Ultrafiltrationsmembranen	79
Tab. 4.1:	Charakteristische Daten einer PVA – Membran	97
Tab. 4.2:	Immobilisierung von <i>Candida Rugosa</i> Lipase auf verschiedenen Materialien	98
Tab. 4.3:	Immobilisierungsstrategien von CR-Lipase mit PVA – Membranen	99
Tab. 4.4:	Konditionierung auf wasserhaltige, organische Lösemittel	100
Tab. 7.1:	Kommerzielle Tenside	112
Tab. 7.2:	Verwendete Lösemittel	113
Tab. 7.3:	Verwendete Substrate und Chemikalien	113
Tab. 7.4:	Verwendete Biokatalysatoren	113
Tab. 7.5:	Konzentrationen für die Veresterung von Menthol	122

Abkürzungsverzeichnis

A	m ²	Oberfläche
A _i		präexponentielle Faktoren der Enzymdesaktivierung
a ₀	m ²	Oberflächenbedarf der Kopfgröße von Tensiden
abs		Absorption
ADH		Alkoholdehydrogenase
AFM		Atomic force microscopy
b		temperaturabhängiger Adsorptionskoeffizient
BSA		Bovine Serum Albumin
c	mol/l	Konzentration
CD		Cyclodextrine
cmc	mol/l	kritische Mizellbildungskonzentration
CLEC		Quervernetzte Enzymkristalle (cross-linked-enzyme-chrysal)
CPCR		Carbonylreductase aus <i>Candida Parapsilosis</i>
CRL		<i>Candida Rugosa</i> Lipase (alt: <i>Candida Cilyndracea</i>)
csac	mol/l	Critical Surface Aggregation Concentration
CT		Chymotrypsin
CTAB		Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CVL		<i>Chromobacterium viscosum</i> Lipase
c _{uc}	mol/l	kritische Mikroemulsionskonzentration
D		Desaktiviertes Enzym
E, [E]		Enzym, Enzymkonzentration
ee	%	Enantiomerenüberschuß
EMR		Enzym-Membran-Reaktor
EO _x		Ethoxylierungsgrad
ES, [ES]		Enzym-Substrat-Komplex, ES-Konzentration
f		Feed
F _{df}	N	Reibungskraft
F _{tf}	N	thermodynamische Kraft
FDH		Formiatdehydrogenase (<i>Candida Bodinii</i>)
GDA		Glutardialdehyd
HLADH		<i>Horse Liver</i> Alkoholdehydrogenase
HLB		Hydrophilic-Lyophilic-Balance
HLL		<i>Humicola linuginosa</i> Lipase
i		Inhibitor
J _v	kg/(m ² h)	Permeatfluß
J _v ^{oo}	kg/(m ² h)	Grenzfluß
k	kg/(m ² h)	Massentransferkoeffizient
k _i		Geschwindigkeitskonstante
K _M	mol/l	Michaelis – Menten – Konstante
l _c	m	Länge des hydrophoben Tensidanteils
M	g/mol	Molmasse
m	kg	Masse
MBG		Microemulsion-based-gel (gelierete Mikroemulsionen)
MW	Da	Molekulargewicht
n	mol	Stoffmenge
NAD ⁺ / NADH		Nicotinadenindinucleotid (oxidierte und reduzierte Form; in phosphorylierter Form: NADP ⁺ / NADPH)
o/w		Öl in Wasser

P		Permeat
P, [P]		Produkt, Produktkonzentration
log P		dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und Oktanol
PCR		Polymerase-Chain-Reaction
PEG		Polyethylenglycol
PNP		p-Nitrophenol
PNPL		p-Nitrophenollaurat
PPL		Pig – Pancreas – Lipase
PTK		Phasentransferkatalysator
PVA		Poly (vinyl alkohol)
Q	kJ/mol	Adsorptionswärme
R	%	Rückhalt
RAL		<i>Rhizopus arrhizus</i> Lipase
R _M	kg/(m ² h)	Membranwiderstandswert
r	μmol/(l min)	Reaktionsgeschwindigkeit
r _{max}	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
r _{Mizelle}	nm	Radius einer inversen Mizelle
S, [S]		Substrat, Substratkonzentration
SDOLP		Sodim diolelphosphate
Sp		Packungsparameter von Tensiden nach <i>Mitchell et al.</i>
STY	kg/(m ³ d)	Space-Time-Yield (Raum-Zeit-Ausbeute)
T	K	Temperatur
T _M	K	mittlere Temperatur
T _l	K	untere Temperaturgrenze (low)
T _u	K	obere Temperaturgrenze (up)
t	min	Zeit
ttn		total-turnover-number (Zyklenzahl)
V	m ³	Volumen
V _{rel}	m/s	Relativgeschwindigkeit des Permeatstroms zu den inversen Mizellen
w/o		Wasser in Öl
w ₀		molares Verhältnis von Wasser zu Tensid
w ₁		molares Verhältnis von Wasser zu Tensid (abzüglich cmc)
YADH		<i>Yeast</i> Alkoholdehydrogenase

Griechische Symbole

α		Anteil des Öls im Gemisch Wasser und Öl
ΔP	bar	Transmembrandruck
ε		Dielektrizitätskonstante
Φ		Phasenbezeichnung (z.B. 1Φ = einphasig)
φ		Volumenbruch der Phase
γ		Tensidmassenbruch im ternären Gemisch
η	Pa s	Viskosität
Π	bar	osmotischer Druck
ρ	g/cm ³	Dichte
Θ		Bedeckungsgrad des Festkörpers

1 Einleitung

1.1 Historie der Biokatalyse in ungewöhnlichen Reaktionsmedien

Die Biotechnologie – vom vorchristlichen Gährungsprozeß bis zur heutigen Gentechnik – ist eine Querschnittstechnologie, die die wissenschaftliche Entwicklung in der Chemie in den letzten Jahrzehnten entscheidend beeinflusst hat. So sind Enzyme mittlerweile für den organischen Chemiker ein wichtiger Bestandteil im Spektrum der Katalysatoren, die ihm zur Verfügung stehen. Durch die Aufklärung und Entwicklung des genetischen Prinzips, aufbauend auf der DNA-Struktur (*Watson 1953*), stellt die Enzymkatalyse heute einen wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Teilbereich in der Biotechnologie dar. Sie ist, im Gegensatz zur organischen Chemie, ein interdisziplinäres Gebiet, welches auf Kooperation von Biologen, Chemikern und Ingenieuren angewiesen ist, um mit klassisch-chemischen Prozessen konkurrieren zu können (*Lilly 1997*). Das entscheidende Argument für den Einsatz von Enzymen in organischen Synthesen ist deren Chemo-, Regio-, und Enantioselektivität. Die Selektivität wird wesentlich durch die sterischen Verhältnisse im aktiven Zentrum der Enzyme ermöglicht. Die Darstellung enantiomerenreiner Substanzen stellt besonders für die Pharmazie, welche seit dem sog. Contergan-Skandal strengerer gesetzlichen Auflagen unterliegt, eine große Herausforderung dar. Auch zur Darstellung von Aromen und Lebensmittelzusätzen ist eine Enantiomerenreinheit oft erforderlich, da die unterschiedlichen Enantiomere sich in ihren Eigenschaften grundlegend unterscheiden können, wie es in Abbildung 1.1 dargestellt ist:

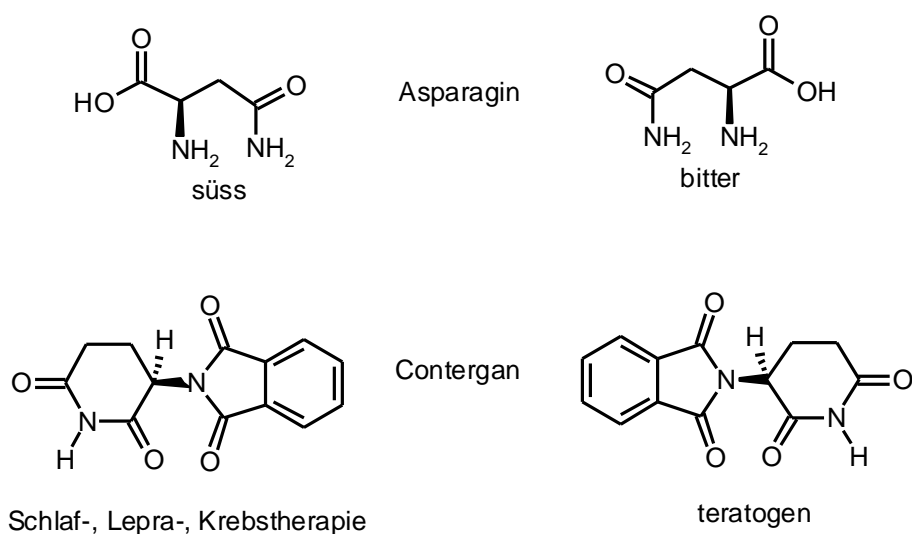


Abbildung 1.1: Strukturen von Thalidomiden (Contergan) und Asparagin in der R- und S-Form

Mittlerweile haben sich verschiedene Enzymkatalysen zur Darstellung chiraler Moleküle industriell etabliert. Zu nennen ist hier die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren, die enantioselektive Kupplung verschiedener Aminosäuren zu therapeutisch nutzbaren Peptiden sowie die Hydrolyse von Penicillinestern (Lalonde 1997).

Ein wesentlicher Schwachpunkt der Enzymkatalyse ist jedoch die begrenzte Verträglichkeit von Biokatalysatoren mit organischen Lösemitteln, welche bei der Umsetzung hydrophober Edukte oft unabdingbar sind. In der Natur kommen Enzyme intra-, extrazellulär und an Zellmembranen gebunden vor. Das natürliche Reaktionsmedium der Enzyme ist daher wässrig, und die Substrate liegen oft in nur sehr geringen Konzentrationen, im Bereich von 10^{-6} Mol/l und darunter, vor. Bei wasserunlöslichen Substraten kann die Reaktionslimitierung aufgrund der Löslichkeit durch die Verwendung organischer Lösemittel umgangen werden (Klibanov 1986, Wong 1989). Auch haben sich Immobilisate, Mehrphasensysteme, Membransysteme, tensidhaltige Lösungen oder wasserlösliche Lösungsvermittler mittlerweile zur Umsetzung hydrophober Substrate mit verschiedenen Enzymen bewährt. In Abb. 1.2 sind vier verschiedene Möglichkeiten zur technischen Durchführung von Enzymreaktionen mit hydrophoben Substraten schematisch dargestellt:

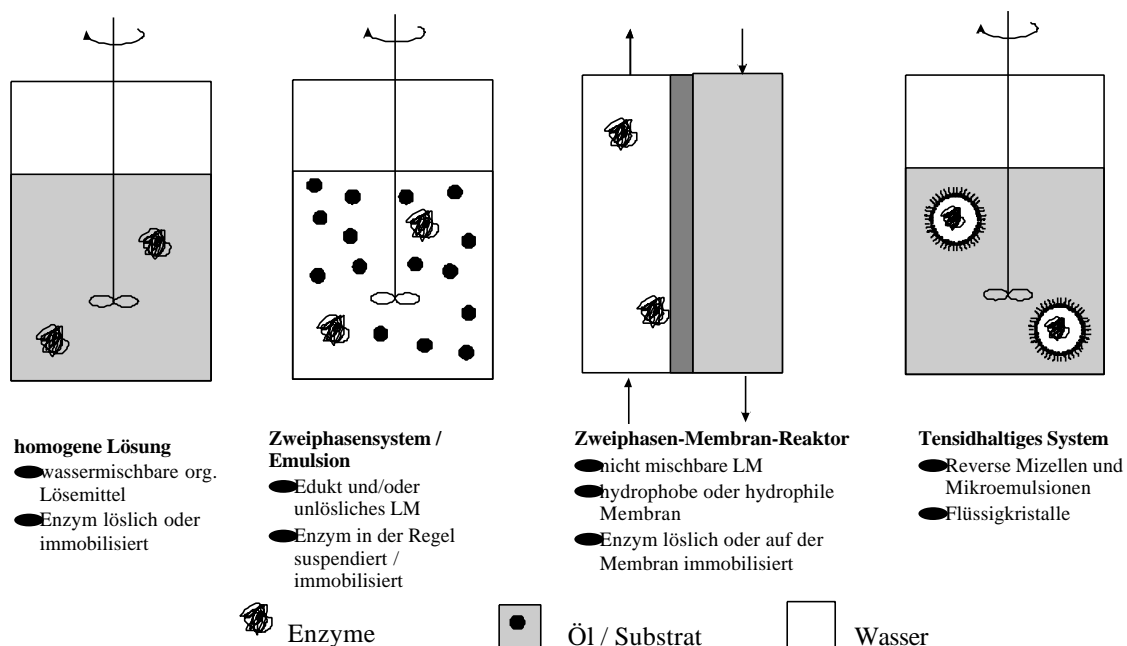


Abbildung 1.2: Möglichkeiten zur Enzymkatalyse mit hydrophoben Substraten

Die Kenntnis über die Wechselwirkungen zwischen Enzymen und dem Reaktionsmedium haben eine große Bedeutung, da durch viele organische Lösemittel die Enzyme schnell denaturiert werden. Als ein wichtiges Konzept zur Optimierung biokatalytischer Prozesse in organischen Reaktionsmedien hat sich die Betrachtung der Polaritätsverhältnisse aller

Reaktionskomponenten, das "log P" - Konzept, erwiesen (Laane 1987, Ke 1998, Garcia-Alles 1998), welches eine direkte Korrelation zwischen Aktivität und Stabilität der Biokatalysatoren anhand der Verteilungskoeffizienten der Reaktionskomponenten in Wasser und Oktanol erlaubt.

1.2 Immobilisierung von Biokatalysatoren

Die Immobilisierung von Biokatalysatoren ist ein aufgrund der hohen Kosten von Katalysatoren gut untersuchtes Gebiet. Durch die Immobilisierung werden Vorteile, wie die Wiederverwendung, kontinuierliche Prozeßführung oder einfach nur die Produktabtrennung ermöglicht. Zur Immobilisierung werden die Biokatalysatoren unter Erhalt ihrer katalytischen Fähigkeiten an Trägerstoffe oder untereinander gebunden (Tischer 1999). Weitere Möglichkeiten umfassen die Einhüllung in Polymere, natürliche oder künstliche Matrices, die Umkapselung durch Membranen oder die Reaktionsführung in Membranreaktoren (Kragl 1997, Hartmeier 1985). Über den oft beobachteten Stabilisierungseffekt der immobilisierten Biokatalysatoren hinaus, lassen sie sich leicht vom Reaktionsgemisch abtrennen und somit wiederverwenden (Reetz 1995).

Je nach der verwendeten Methode kann die Immobilisierungsart der Biokatalysatoren klassifiziert werden, wie es im folgenden Schema dargestellt ist:

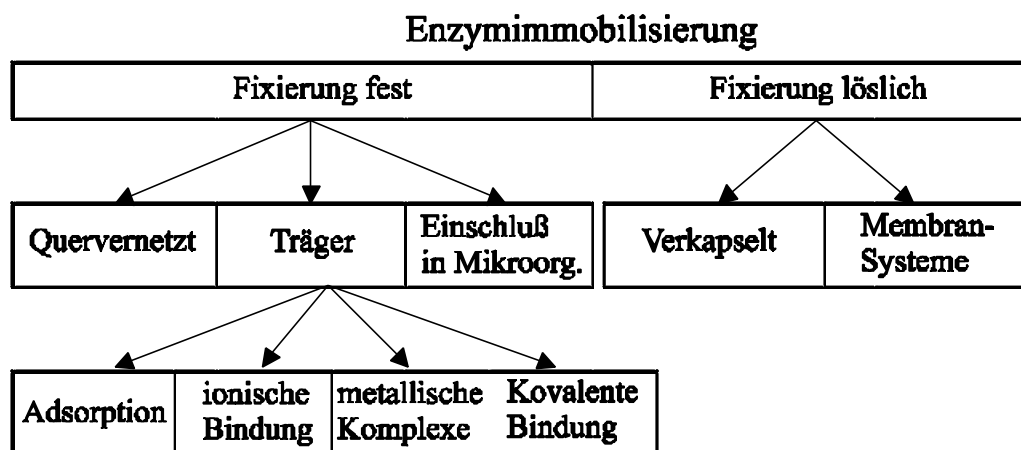


Abbildung 1.3: Immobilisierungsarten von Enzymen

Industriell haben sich die Immobilisierung von Glucoseisomerase, Penicillinamidase, l-Aminosäure-Dehydrogenasen auf Trägern aber auch die Immobilisierung von Enzymen zur On-Line Analytik in Biosensoren mittlerweile etabliert (Furusaki 1988, Lalonde 1997). Die

vielen Immobilisierungsarten von Hefe für unterschiedliche Anwendungen müssen hier auch erwähnt werden (*Hartmeier 1994, Virkajärvi 1999*).

1.3 Katalytisch aktive Membranen

Die Vorteile der Membrantrenntechnik, wie geringer Energiebedarf, kontinuierliche Prozeßführung, sichere Handhabung, Umweltverträglichkeit und schonender Umgang mit dem Produkt, machen sie für die industrielle Anwendung äußerst interessant. Diesen Vorteilen stehen hauptsächlich zwei Nachteile gegenüber: Erstens läßt sich die Selektivität dieser Verfahren in der Regel nur verbessern, wenn gleichzeitig der Stofffluß sinkt. Und zweitens ist die Membrantrenntechnik ein relativ langsames Trennverfahren (*Mulder 1990*). Jedoch hat sich die Membrantechnik in den vergangenen Jahren von einem exotischen Sonderverfahren zu einem zuverlässigen Standardverfahren entwickelt. Vor diesem Hintergrund gewinnen ingenieurmäßige Fragestellungen, wie die Prozeßentwicklung, d.h. Modulentwicklung und -auslegung in Kombination mit den anderen Grundoperationen, wie Reaktion oder Destillation, an Bedeutung. Membrantrennverfahren sind modular aufgebaut, was eine Angleichung an eine benötigte Kapazität sehr vereinfacht. Bei der Filtration mit Membranen werden je nach den Filtrationsgrenzen (Abb. 1.4) verschiedene Typen unterschieden:

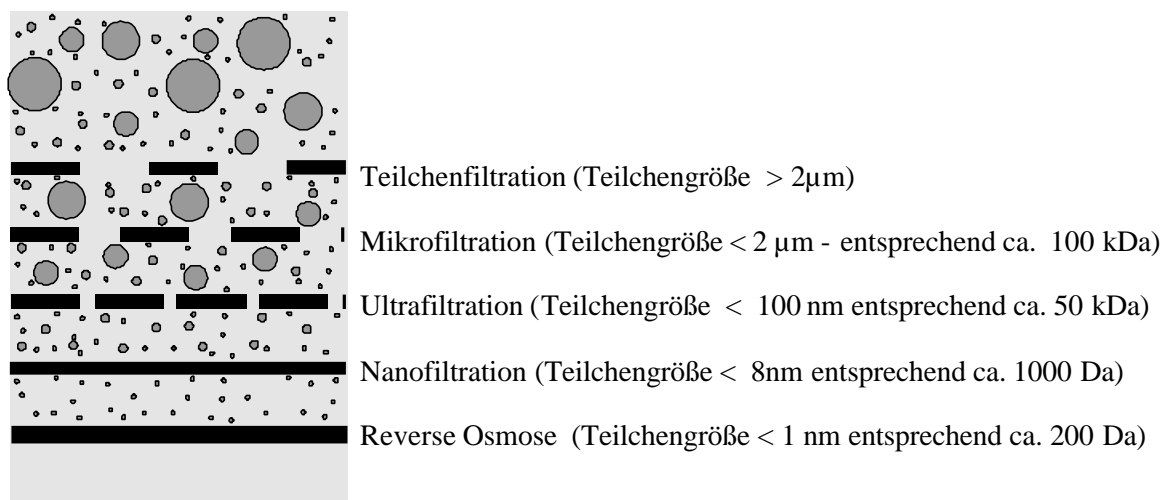


Abbildung 1.4: Verschiedene Filtrationsarten nach der Größe der abzutrennenden Substanz

Die Medizin ist eines der Haupteinsatzgebiete der Membrantechnik. Hier werden etwa 50% des Umsatzes der Branche erzielt (*Paul 1998*). Besonders bedeutend ist hierbei der Einsatz von Membranen in künstlichen Nieren. In der Lebensmittelindustrie werden Membranen beispielsweise zur Klarfiltration von Getränken wie Wein und Bier eingesetzt, aber auch zur

Abtrennung von Proteinen aus Molke werden Membranen verwendet. Die Analytik stellt ein weiteres Einsatzgebiet der Membrantechnik dar, die sonst hauptsächlich zur Anreicherung und Reinigung genutzt wird. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Anwendungsgebiete der Membranverfahren als Trenntechnik.

Tabelle 1.1: Anwendungen der Membrantechnik (Paul 1998)

Mikrofiltration	Sterilisation, z.B. in der Biotechnologie, Pharmazie oder Hygiene Partikelabtrennung in der Lackindustrie und Kosmetik Rohstoffgewinnung in der Nahrungsmittelindustrie Klärung und Konzentrierung in der Getränkeindustrie Reinstwasserherstellung für die elektronische Industrie
Ultrafiltration	Konzentrierung von Lösungen, z.B. in der Lebensmittelindustrie Klärung von Getränken Aufbereitung von Fermenterlösungen Abwasserbehandlung, z.B. Öl-Emulsions-Trennung Trinkwasseraufbereitung
Umkehrosmose	Trinkwassergewinnung durch Meeres- oder Brackwasserentsalzung Aufbereitung von Deponiesickerwasser Prozeßwasseraufbereitung, z.B. Kesselspeisewasser oder in der Mikroelektronik Abwasseraufbereitung, Eliminierung von Salzen Aufkonzentrierung von Lösungen
Dialyse	Blutentgiftung, künstliche Niere Tauchlaugenaufbereitung, Viskoseindustrie Alkoholreduzierung von Bier Entsalzung von Polymerlösungen Fließinjektionsanalyse
Elektrodialyse	Trinkwassergewinnung durch Entsalzung von Brackwasser Salzgewinnung durch Konzentration von Seewasser Chlorgewinnung aus Kochsalz durch Membranelektrolyse Demineralisierung von Getränken Elektrodimerisierung von Acryl- zu Adiponitril
Gastrennung	Stickstoff- bzw. Sauerstoffanreicherung in Luft Gewinnung von Edelgasen aus Naturgas Prozeßgasbehandlung, z.B. Abtrennen des Wasserstoffs von Stickstoff, Kohlenmonoxid, Methan Tauchgasaufbereitung, Heliumrückgewinnung Oxygenierung von Blut
Dampfpermeation	Trennung von Kohlenwasserstoffen und Luft, z.B. Benzindampfückgewinnung Abluft-/ Abgas-Behandlung, z.B. Rückgewinnung chlorierter Kohlenwasserstoffe Wasserdampfpermeation, z.B. Drucklufttrocknung Prozeßgastrennung, z.B. Veresterung: Methylester/ Methanol
Pervaporation	Entwässerung organischer Lösungen Abwasserbehandlung, z.B. Phenolentfernung Abtrennung von Niedersiedern (z.B. Chloroform) und Hochsiedern (z.B. Vanillin) aus Wasser

Vor allem die Umweltverträglichkeit der Membrantechnik wird ihr in Zukunft noch mehr Bedeutung zukommen lassen. Das Recycling von Prozeßwasser oder die Rückgewinnung von wertvollen Rohstoffen oder schädlichen Substanzen wird durch die Membrantechnik

vereinfacht. Die Membrantechnik ermöglicht die Trennung von Stoffen, die sonst anderweitig nicht oder nur sehr aufwendig getrennt werden können. In der Bioreaktionstechnik ist die Verwendung von Enzym-Membran-Reaktoren mittlerweile etabliert. Enzym-Membran-Reaktoren nutzen die Membranfiltration zur Rückhaltung von Enzymen, die als lösliche Katalysatoren zum Einsatz kommen (*Kragl 1996 a*). Niedermolekulare Substrate und Produkte können die Membran (im Ultrafiltrationsbereich) ungehindert passieren und durch einen kontinuierlichen Substratstrom ersetzt werden. Somit werden die Verweilzeiten von Substraten und Katalysatoren voneinander entkoppelt.

Die Entwicklung der Membrantechnik nicht nur als Trennoperation, sondern auch als Reaktionsunterstützung eröffnet weitere Potentiale. Dazu werden Polymermembranen durch Reaktivpolymere ersetzt oder ergänzt, die dann als Träger von Enzymen fungieren können. Als Beispiele für Reaktivmembranen sei auf keramische Membranen mit dünnen Pd-Filmen (*Shu 1997, Basile 1996*) oder Polymermembranen mit eingelagertem Katalysator (*Kinoshita 1999, Hodges 1990*) oder an der Oberfläche gebundenen Enzymen (*Ulbricht 1996, Schmidt-Steffen 1992*) verwiesen. Die Membran kann außerdem als Trenn- oder Kontaktschicht zwischen zwei Phasen wirken (*Doig 1998 & 1999*). Verwendet man einen Membranreaktor um ein Produkt ständig aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, kann auf diese Weise der Umsatz einer gleichgewichtslimitierten Reaktion deutlich erhöht werden (*Prabhu 1999*). Manchmal können auch Stofftransportlimitierungen, wie Diffusion, durch den Einsatz eines Membranreaktors verringert werden (*Golmann 1997*). Für den letzteren Fall kommen allerdings nur sehr durchlässige Membranen in Betracht. Polymere werden oft als Membranmaterial eingesetzt, da sie flexibel und billig in der Verarbeitung sind. Ihre geringe Temperaturstabilität ist allerdings ein Nachteil. Bei moderaten Temperaturen überwiegen jedoch die Vorteile.

Zur Beschreibung einer Reaktivmembran, bestehend aus dem Verbund aus Membran und Enzym, werden die in Tabelle 1.2 dargestellten Charakteristika verwendet:

Tabelle 1.2: Charakterisierung eines Membran-Enzym-Verbundes

Biochemische Charakteristika	Mechanische Charakteristika	Reaktionstechnische Charakteristika
<ul style="list-style-type: none"> • Aktivität und Stabilität der Biokatalysatoren • Produktivität mit optimierter Substratkonzentration • Effekt aller Stoffe (Substrate, O₂, Trägermaterialien....) • pH- und T- Sensitivität • Haltbarkeit ohne Reaktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Partikelgröße, -form, -größenverteilung • Biokatalysatorbedeckung • Dichte des Reaktionsmediums und Quellvermögen • Kompressibilität 	<ul style="list-style-type: none"> • mittlere Verweilzeit • Druck, Temperatur • Diffusionskoeffizienten der Komponenten • Reaktorparameter

Während Biologen das größte Optimierungspotential für einen Prozeß bei den biochemischen Charakteristika sehen und daher oft auf kommerziell erhältliche Membranen zurückgreifen, bietet eine Abstimmung aller Charakteristika zueinander sicherlich höhere Potentiale.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Aufgabe der Arbeit bestand in der Entwicklung von neuen Enzym–Membran–Konzepten für Biotransformationen mit hydrophoben Substraten. Aufgrund der geringen Löslichkeit von hydrophoben Substraten in wäßrigen Reaktionsmedien ist eine biokatalytische Reaktion oft wegen der damit einhergehenden geringen Reaktionsgeschwindigkeit oder den geringen Raum-Zeit-Ausbeuten limitiert. Im Mittelpunkt stehen daher neue Reaktionstechniken, welche mit bereits verfügbaren Ansätzen aus dem Bereich der Mehrphasenkatalyse, der Biokatalyse in organischen Lösemitteln und der Membrantechnik verglichen werden sollen. Ein wesentliches Hilfsmittel stellen hierbei Mikroemulsionen als Reaktionsmedien sowie neu entwickelte Membranen zur Immobilisierung dar. Hierbei muß zwischen zwei Systemen grundlegend unterschieden werden:

- Es wird ein Enzym–Membran–Reaktorkonzept bei der Verwendung von Mikroemulsionen untersucht. Bei den Membranen handelt es sich um kommerziell erhältliche Ultrafiltrationsmembranen, die für die Filtration von Mikroemulsionen speziell konditioniert werden. Die Wechselwirkungen der Membranen mit dem Reaktionsmedium, speziell mit den Tensiden, spielen bei diesem Konzept eine große Rolle und werden weitergehend untersucht.
- Es wird eine neue Generation von Reaktivmembranen vorgestellt, bei denen der Biokatalysator in der Membranmatrix immobilisiert ist. Hierbei wird der Membransynthese und deren Charakterisierung eine besondere Rolle zugeschrieben.

Als Biokatalysatoren werden ganze Zellen (*Bakers Yeast*), Oxidoreduktasen für die Reduktion der entsprechenden prochiralen Ketone (verschiedene ADH, FDH) und auch Lipasen (*Candida Rugosa*) zur Racematspaltung eingesetzt. Bei den verwendeten Substraten handelt es sich einerseits um Modellsubstrate andererseits auch um Vorprodukte für Feinchemikalien. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen neue Grundlagen für die Enzymkatalyse in mesoskopisch strukturierten Systemen aufzeigen. Im folgenden werden die Ziele der beiden Teilbereiche dieser Arbeit kurz umrissen:

Enzym – Membran – Reaktor bei der Verwendung von Mikroemulsionen

Durch die enzymkatalysierte Reaktion in Mikroemulsionen soll ein wirtschaftlicher Zugang zur technischen Herstellung enantiomerenreiner Produkte aus der Reihe der wasserunlöslichen Alkohole gegeben werden. Diese Produkte stellen wichtige Vor- und Zwischenprodukte für die

Synthese von Wirkstoffen dar. Ein Konzept für die Reaktionstechnik und Prozeßführung einer kontinuierlichen, enzymkatalysierten Synthese soll auf der Basis der Kinetik, Thermodynamik und der Mikroemulsionsparameter entwickelt und optimiert werden. Der Erhalt der Enzymaktivität über eine möglichst lange Zeit sowie die vollständige Rückgewinnung des Enzyms mittels einer Ultrafiltration spielen für die Wirtschaftlichkeit eines solchen Verfahrens eine entscheidende Rolle. Da die Ultrafiltration von Mikroemulsionen eine neue Disziplin in der Membrantechnologie darstellt, sind die Wechselwirkungen zwischen den Membranen und den Ölen sowie den Tensiden von großem Interesse.

Reaktivmembran

Das Ziel der Entwicklung besteht darin, eine Reaktivmembran und ein Verfahren zu ihrer Herstellung zu finden, welche die Nachteile der bekannten Reaktivmembranen und deren Herstellungsverfahren nicht aufweisen. Insbesondere sollen Reaktivmembranen geschaffen werden, die zusätzlich aufgrund ihrer hohen Porosität Stofftransportlimitierungen nur in geringfügigem Maße aufweisen, da der Stofftransport hauptsächlich konvektiv abläuft. Diese hoch poröse Struktur soll durch ein sehr einfaches Verfahren in einem Schritt und mit großer Variabilität hinsichtlich der Permeabilität hergestellt werden. Wird an oder in der Membran ein Verbund mit einem Enzym hergestellt, ergibt sich die Möglichkeit zum einen die Membran als Reaktivmembran zur Edukt / Produkt - Trennung zu verwenden, zum anderen aber auch enzymkatalysierte Reaktionen durchzuführen, die aufgrund einer Produktinhibierung mit konventionell immobilisierten Biokatalysatoren konkurrieren kann.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Filtrationsmembran und deren Charakterisierung, welche durch eine Enzymenimmobilisierung zu einer katalytisch aktiven Membran funktionalisiert werden kann. Hierfür sollen geeignete Strategien gefunden werden.

3 Enzym – Membran – Konzept bei Verwendung von w/o-Mikroemulsionen

3.1 Enzymkatalysierte Reaktionen in w/o-Mikroemulsionen

3.1.1 Mikroemulsionen

Es gibt unterschiedliche Strategien, um die Löslichkeit zweier nicht oder nur beschränkt ineinander löslichen Flüssigkeiten zu erhöhen. Zum einen können Lösungsvermittler wie Alkohole, Aceton oder DMF dem System zugesetzt werden, zum anderen können ionische oder nichtionische amphiphile Stoffe, z.B. Tenside oder Blockcopolymere, die Löslichkeit durch die Bildung von thermodynamisch stabilen Phasen erhöhen. Die Darstellung des Phasenverhaltens von ternären Gemischen aus Wasser, Öl und Amphiphilen erfolgt, wie in Abb. 3.1 gezeigt, bei konstantem Druck in Phasenprismen, bei denen die Grundfläche aus einem Gibbs'schen Phasendreieck und die Ordinate aus der Temperatur besteht.

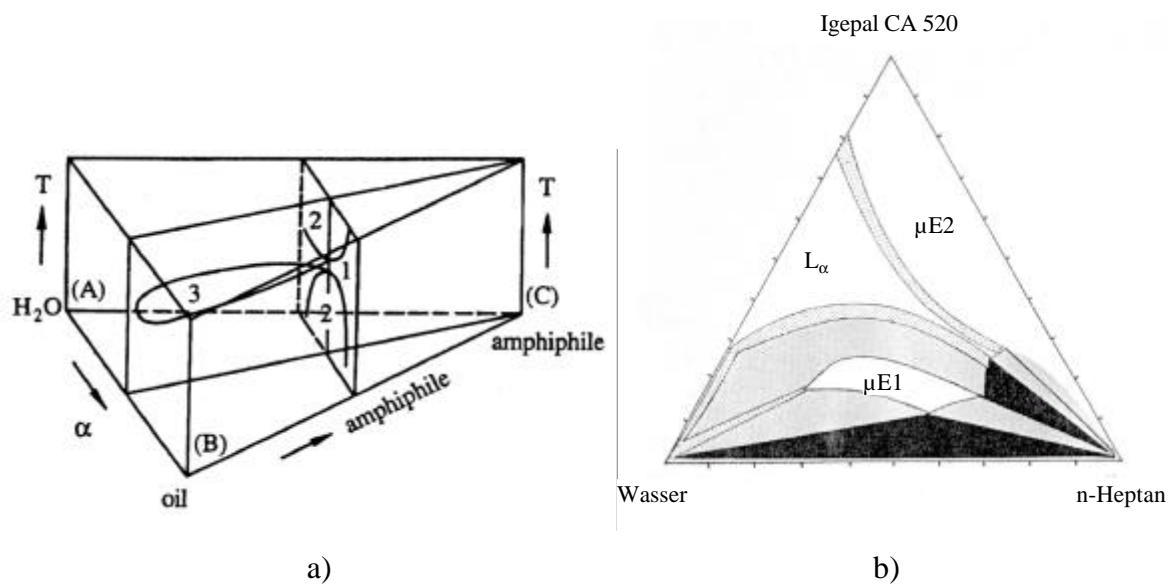


Abbildung 3.1: a) Schematische Darstellung eines Phasenprismas mit der Anzahl der Phasen. b) Phasendreieck von Igepal CA520/ n-Heptan / Wasser bei 25°C; $\mu E2$: Die Mischung ist einphasig, es liegen inverse Mizellen und andere w/o-Strukturen vor; $\mu E1$: Bikontinuierliche Mikroemulsionsstruktur; Grau: Die ternäre Mischung ist zweiphasig; Schwarz: Die ternäre Mischung ist dreiphasig; L_α : Invers-mizellare Lösung und Flüssigkristalle liegen nebeneinander vor (aus Grätz 1998)

Charakterisiert werden die ternären Mischungen durch den Tensidmassenbruch (γ) sowie durch das Massenverhältnis (α) von Öl im Gemisch von Wasser und Öl.

$$g = \frac{m_{Tensid}}{m_{Tensid} + m_{Wasser} + m_{Öl}} \quad (1)$$

$$a = \frac{m_{Öl}}{m_{Wasser} + m_{Öl}} \quad (2)$$

Um das Phasenverhalten eines gegebenen ternären Gemisches darzustellen, wird zweckmässigerweise das Phasenverhalten von Schnitten durch das Phasenprisma bei konstantem Wasser-zu-Öl-Verhältnis ($\alpha = \text{konst.}$ – siehe "Fisch" in Abb. 3.1a) sowie bei konstantem Tensidmassenbruch ($\gamma = \text{konst.}$) untersucht. Einphasige Mikroemulsionen sind optisch transparente, thermodynamisch stabile Mischungen. Die makroskopisch homogenen Mischungen erweisen sich jedoch mikroskopisch als heterogen im Nanometerbereich. Es bilden sich je nach Zusammensetzung kleine Wassertropfen in Öl, kleine Öltröpfchen in Wasser oder mikroskopisch heterogene Mischungen im Zwischenbereich, wobei die Grenzfläche zwischen den Phasen mit Tensid belegt ist. Die sich bildenden Strukturen sind durch Elektronenmikroskopie oder auch Streulichtmessungen gut nachzuweisen (*Schwuger 1995, Schubert 1996, Sjöblom 1996*). Ebenso gibt die Viskosität Aufschluß über die sich in einer w/o-Mikroemulsion bildenden Strukturen (sphärische oder elyptosodale inverse Mizellen, bikontinuierliche Strukturen (*Lade 2000*)) :

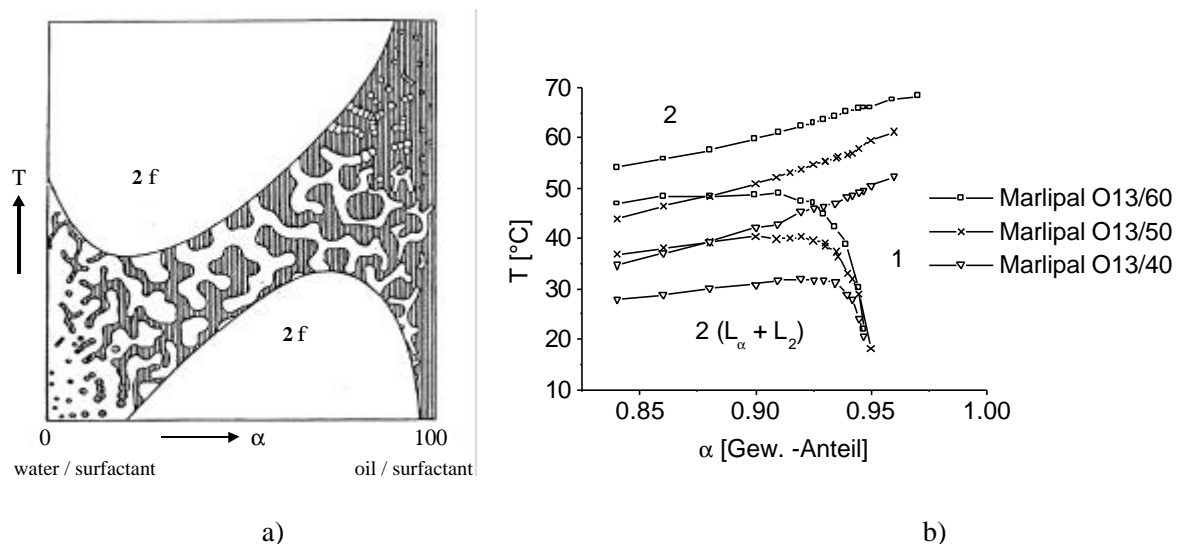


Abbildung 3.2: a) Schematische Darstellung der Strukturen im Einphasenkanal; b) Ölreiche Seite des Einphasenkanals bei Verwendung verschiedener Tenside (Wasser / Cyclohexan / Marlipal O13-XO) (aus *Lade 2000*)

Es gibt für die Bildung einer einphasigen Mikroemulsion je nach Zusammensetzung eine obere und eine untere Temperaturgrenze, bei der der Übergang in ein mehrphasiges System eintritt. Zur Charakterisierung von Mikroemulsionen wird zumeist die mittlere Temperatur

($T_M = (T_l + T_u)/2$ mit T_l und T_u für die Temperaturen, bei denen bei $\alpha = 0,5$ ein Mehrphasensystem entsteht) verwendet. Man spricht bei den in dieser Arbeit untersuchten Wassertropfen, die von einer kontinuierlichen Ölphase umgeben sind, von einer "Wasser - in - Öl - Mikroemulsion" (kurz w/o) oder "inversen Mizellen". Für die Größe einer inversen Mizelle, eines Wassertropfens in Öl, ist das molare Verhältnis von Wasser zu Tensid maßgebend. Dieses ergibt sich aus dem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis einer inversen Mizelle:

$$\frac{V_{Kugel}}{A_{Kugel}} = \frac{n_{H_2O} V_{H_2O}}{n_{Tensid, Grenzfläche} A_{Tensid, Grenzfläche}} \quad (3)$$

$$\text{mit } w_0 = \frac{n_{H_2O}}{n_{Tensid}} \quad \text{und } w_1 = \frac{n_{H_2O}}{n_{Tensid} - n_{Tensid, Monomer}} \quad (4,5)$$

ergibt sich der Radius des Wasserkerns einer Mizelle:

$$r_{Mizelle} = w_1 \frac{9 \cdot 10^{-29} m^3}{A_{Tensid, Grenzfläche}} \quad (6)$$

Aufgrund des unterschiedlichen Oberflächenbedarfs des hydrophilen Anteils nichtionischer Tenside kommt man zu folgender Näherung:

$$r_{Mizelle} = (0,5 \dots 2,5) \cdot w_1 \quad [10^{-10} m] \quad (7)$$

Aus Gleichung 7 folgt, daß es bereits im Bereich kleiner Verhältnisse von Wasser zu Tensid genügend Raum im Tropfen gibt, um Moleküle darin zu beherbergen. Zusätzlich hat es sich gezeigt, daß sich die Radien von Tropfen, die beispielsweise ein hydrophiles Enzym enthalten, aufgrund des enthaltenen Moleküls noch vergrößern können (Holmberg 1994, Luisi 1995).

Zur Charakterisierung der Tenside wird das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten der einzelnen Molekülteile in polaren oder apolaren Lösemitteln durch den HLB-Wert (Hydrophilic-Lyophilic-Balance) gekennzeichnet. Für Tenside ergibt er sich aus:

$$HLB = 20 * \frac{M_H}{M} \quad (8)$$

M_H ist die Molmasse des hydrophilen Molekülteils und M die gesamte Molekülmasse. Bei anderen Berechnungsmethoden wird der HLB-Wert oft aus Inkrementensystemen berechnet, bei denen den hydrophilen und hydrophoben Gruppen des Tensides unterschiedliche Gruppenzahlen zugeordnet werden, aus denen sich schließlich der HLB-Wert berechnen läßt (Pfüller 1986).

Enthält das Wasser Elektrolyte, so verändert sich die Löslichkeit des Tensides im Wasser. Zugegebene Salze können die Löslichkeit des Tensides erhöhen, aber auch erniedrigen (*Kahlweit 1985 & 1995*). Erklärt wurde dieses mit dem HSAB-Prinzip (Hard-Soft-Acid-Base = Hart-Weich-Säure-Base). Salze harter Säuren und harter Basen verringern die Löslichkeit von Wasser und Tensid, während Salze weicher Säuren und harter Basen, so wie Salze harter Säuren und weicher Basen sie vergrößern. Dementsprechend verringert sich die Löslichkeit von Wasser und Tensid mit z.B. NaCl oder Na₂SO₄ als Zusatz, während sie bei Zugabe von z.B. Natriumalkylsulfaten erhöht wird. Festgestellt werden kann dieses durch die Veränderung der oberen und unteren Temperatur, T_l und T_u, bei der sich eine Mikroemulsion bildet. Mittlerweile sind die physikalischen Vorgänge in Mikroemulsionen weitgehend aufgeklärt und das HSAB - Prinzip konnte weitgehend verifiziert werden. So zeigte sich, daß im wesentlichen die Krümmung des Tensidfilmes durch Salzzusätze beeinflusst wird. Die Krümmung eines Tensidfilmes kann, ausgedrückt durch den Packungsparameter Sp (*Mitchell 1981*), durch das Verhältnis des Oberflächenbedarfes des hydrophilen zum hydrophoben Tensidanteils analog zum HLB-Wert angegeben werde:

$$Sp = \frac{V}{a_0 \cdot l_c} \quad (9)$$

Hierbei ist V das Volumen des hydrophoben Alkanrestes, l_c dessen Länge und a₀ der Oberflächenbedarf eines Moleküls in der Grenzfläche. Bei Sp Werten um eins (wenig Krümmung, HLB = 8-10) werden bevorzugt bikontinuierliche Mikroemulsionen gebildet. Bei höheren Werten (negative Krümmung, HLB = 4-6) wird die Bildung einer w/o-Mikroemulsion bevorzugt. Je weiter sich der Sp - Wert von eins unterscheidet, desto stärker ist jedoch auch die Löslichkeit in einer der zu dispergierenden Flüssigkeiten (ausgedrückt durch die cmc oder c_{uc}). Ein moderater Packungsparameter gewährleistet daher auch die Bildung eines Tensidgrenzflächenfilms. Die Einflüsse von Zusätzen, die für die Enzymkatalyse unabdingbar sind, wurden durch Fletcher et al. untersucht (*Fletcher 1989*).

Tabelle 3.1: Einfluß verschiedener Faktoren auf die Krümmung des Tensidfilmes (Krümmung von der Wasserseite her betrachtet)

Bestandteil	Effekt auf die Krümmung	Erklärung
Salze	negativ mit zunehmendem Salzgehalt	effektive Abschirmung des hydrophilen Tensidanteils reduziert a_0
Kettenlänge des Öls	positiv mit zunehmender Kettenlänge	Einbau des Öls in der Grenzfläche (Solvatation) sinkt mit zunehmender Kettenlänge
Alkohole (Co-Tensid)	negativ solange $l_{\text{alkohol}} < l_c$, sonst positiv	Einfluß des hydrophilen (a_0) und hydrophoben (l_c) Anteils des Co-Tensides auf die Gesamtkrümmung
Temperatur (ionisches Tensid)	positiv mit steigender Temperatur	Tensid-Gegenion Dissoziation steigt
Temperatur (nichtionisches Tensid)	negativ mit steigender Temperatur	Kopfgruppengröße verkleinert sich mit zunehmender Dehydratisierung

Die in einer Mikroemulsion vorliegenden Strukturen – wie Mizellen, inverse Mizellen oder auch die bikontinuierlichen Netzwerke - können als Mikroreaktoren für anorganische, organische (Tjandra 1998) und bioorganische Reaktionen genutzt werden, welche eine große Grenzfläche zwischen Wasser und Öl benötigen. Beispiele hierfür, wie in Abb. 3.3 gezeigt, sind die Darstellung von Nanopartikeln (Fendler 1987, Lade 2000, Schmidt 1999), Hydroformylierungen (Vyve 1999), Enzymkatalysen aber auch Polymerisationen (Morgan 1998, Co 1998, Chew 1998).

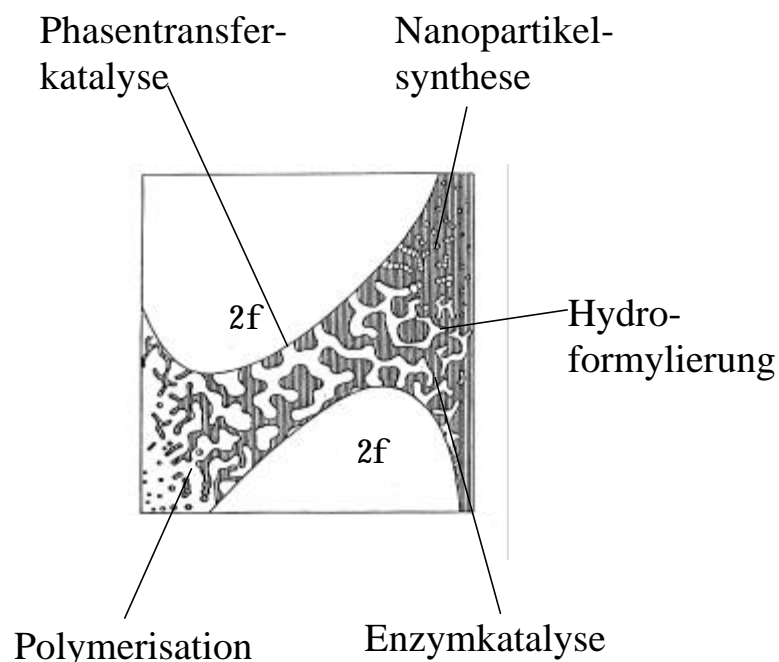


Abbildung 3.3: Reaktionen in Mikroemulsionen

Inverse Mizellen in w/o-Mikroemulsionen sind keine starren Assoziate. Es kommt aufgrund der geringen Oberflächenspannung bei einer Tropfenkollision zu einem schnellen Austausch des Tropfeninhalts (*Fletcher 1987 b, Moulik 1998*). Durch den dynamischen Austausch der Tropfen wird z.B. die Fällung von Nanopartikeln oder die Enzymkatalyse von Formiatdehydrogenase (welche sich nur im wäßrigen Anteil einer Mikroemulsion vollzieht) gewährleistet.

3.1.2 Enzymkatalyse in Mikroemulsionen*

Gängige Phasentransferkatalysatoren (PTK) wie Kronenether sind in den seltensten Fällen biokompatibel, da sie im wesentlichen dafür entwickelt wurden, anorganische Salze mit geringer molekularer Größe in organische Lösungen zu transferieren, Enzyme oft inhibieren oder vollständig deaktivieren. Zusätzlich geht von vielen PTKs aufgrund der hohen Fischtoxizität (speziell bei quarternären Ammoniumsalzen) eine zusätzliche Gefahr für die Umwelt aus. Die Entwicklung auf dem Gebiet der Cyclodextrine (CD) könnte ein Durchbruch in der biokompatiblen Phasentransferkatalyse bedeuten: Noch sind die CDs jedoch schwer herzustellen und bieten eher bei mimetischen Prozessen ein großes Potential in der Katalyse (*Breslow 1998, Takahashi 1998*). Bei Verwendung von wasserunlöslichen Substraten ist daher die Verwendung von Mikroemulsionen eine sinnvolle Alternative zu Mehrphasenreaktionsmedien oder PTKs. Mit Beginn der Enzymkatalyse in organischen Lösemitteln durch A.M. Klibanov und in Mikroemulsionen durch P.P. Luisi wurden viele Reaktionen mit hydrophoben Substraten erst möglich. Neben den Arbeitsgruppen von Klibanov am MIT und Luisi aus der Schweiz haben Forschungen in den Gruppen von Laane in den Niederlanden, Martinek in der ehem. Sowjetunion, Robinson aus England sowie Holmberg aus Schweden die Grundlagen für die Enzymkatalyse in Mikroemulsionen in den 80er und 90er Jahren gelegt. Hierbei haben sich Mikroemulsionen nicht nur als nützliches Instrument erwiesen, um Wasser und apolare Substanzen miteinander in Kontakt zu bringen. Es ergaben sich aufgrund der nanoskalinen Strukturen in Mikroemulsionen interessante Effekte, welche für die Untersuchungen der Enzymkatalyse vorteilhaft sind:

* Teile dieses Kapitels sind veröffentlicht in: B. Orlich, H. Berger, M. Lade, R. Schomäcker. Stability and activity of alcohol dehydrogenases in w/o-microemulsions: Enantioselective reduction including cofactor regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 70(6), S. 638-646

- Überwindung der Inkompatibilität der Reaktionspartner und somit die Möglichkeit hoher Konzentrationen apolarer Reaktanden
- Verschiebung von thermodynamischen Gleichgewichten bei Kondensations- und Hydrolysereaktionen durch die Einstellung des Wassergehaltes der Mikroemulsion
- Möglichkeit der Unterdrückung von Produktinhibierungen
- Möglichkeit der gesteigerten Regioselektivität, Stabilität und Aktivität von Enzymen
- Möglichkeit der Cryoenzymologie (da das Wasser in den inversen Mizellen je nach Bedingungen bis zu -20°C nicht gefriert)
- Möglichkeit der Untersuchung von Proteinen unter biomimetischen Aspekten in transparenten Lösungen

Zu den wohl am besten untersuchten Enzymen in Mikroemulsionen gehören die Lipasen, da sich diese Enzyme als äußerst aktiv und stabil in dem ungewöhnlichen Reaktionsmedium erwiesen. Mittlerweile sind die meisten Wechselwirkungen zwischen den Reaktionsmedien und den Proteinen bekannt und viele im wässrigen Reaktionsmedium gut untersuchte Enzyme können auch in Mikroemulsionen unter Erhalt ihrer Aktivität und Stabilität solubilisiert werden. Die folgende ausführliche Tabelle 3.2, die aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, gibt über den Stand der Forschung in den letzten Jahren Auskunft:

Tabelle 3.2: Enzymkatalysierte Reaktionen in w/o-Mikroemulsionen

Enzym	w/o – Mikroemulsion (Tensid - Öl)	Untersuchung	Referenz
YADH / FDH	Marlipal O13-60 – Cyclohexan	Cofaktorregenerierung; Aktivitätssteigerung der YADH; EMR	<i>Orlich 1999 b</i>
Lipoxygenase	AOT – Isooktan	Einfluß des Wassergehaltes (speziell w_0) auf die Aktivität	<i>Perez-Gilabert 1998</i>
Lipoxygenase	AOT – Isooktan	Einfluß des pH-Wertes in rev. Miz. auf Aktivität (Konzentrationsabh.)	<i>Rodakiewicz-Nowak 1996</i>
5 versch. Lipasen (u.a. CRL und PPL)	AOT – Toluol AOT – Heptan	Veresterungsreaktionen von Diterpenen: Aktivitätssteigerung, Einfluß der Kettenlänge der Säure	<i>Gonzales-Navarro 1998</i>
α – CT	AOT – Oktan	Kovalente Anbindung eines Fluoreszenzmarkers: Stabilitätssteigerung in μE [$f(w_0)$ – mehrere Monate]	<i>Dorovska-Taran 1993</i>
Versch. Lipasen	AOT – Isooktan	p-Nitrophenylesterhydrolysen als Substrate für Aktivitätsuntersuchungen	<i>Manoj 1997, Schomäcker 1988</i>
CRL – YADH	P40 (mit Triton X35); Tween 85 (mit Ethylenglycol); AOT; Brij56 – Cyclohexan; Heptan	Kombination von Lipase und ADH; Cofaktorregenerierung; Aktivität in unterschiedlichen μE – Zusammensetzungen sowie unterschiedlichen Reaktionsmedien	<i>Yang 1994, 1995</i>
Cutinase	AOT – Isooktan	Spin-Label am aktiven Zentrum; Aktivität und Stabilitätsuntersuchung (w_0)	<i>Papadimitriou 1997</i>
CRL	AOT-Lecetin / Isooktan	Kinetische Untersuchung (umsatzabhängig)	<i>Knezevic 1998</i>
Urease	SDS – Hexan	Darst. eines potentiometrischen Harnstoffsensors	<i>Das 1997</i>
α – CT, versch. Lipasen, Lipoxygenase, Lysozyme	AOT – Heptan AOT + Natriumtaurocholat – Heptan	Solubilisierung und Faltung von Proteinen in reversen Mizellen (zeitabhängig), Aktivität	<i>Lee 1997, Freeman 1998</i>
Lipase	Kaliumdodecanoat – versch. Öle	Effekt der Kettenlänge des Öls auf die Triglyceridsynthese	<i>Oh 1996</i>
CVL	AOT – Heptan; CTAB – Heptan	Einfluß des Wassergehaltes auf die Produktverteilung der Glycerinveresterung	<i>Fletcher 1987a</i>
PPL	AOT – Oktan	Kinetik der Hydrolyse von Triglyceriden; Modellbildung	<i>Malakhova 1983</i>
α – CT	AOT – Isooktan	Theorie zur "Superaktivität" von Hydro-lasen in rev. Miz.; Abh. vom w_0 – Wert	<i>Ruckenstein 1990</i>
CRL, HLL	AOT – Isooktan	Regioselektive Veresterung von Butan-1,3-diol mit Ölsäure	<i>Macris 1996</i>
BSA	PFPE – CO_2	Erste Proteine in einer überkritischen μE	<i>Johnston 1996</i>
YADH	AOT – Isooktan	Theorie der Desaktivierungskinetik in μE für ADH	<i>Chen 1995</i>
α – CT, HLADH, BSA, Lysozyme, Trypsin, γ -Globulin	AOT – Oktan	Umfassende Sedimentationsanalyse in Abh. von verschiedenen μE – Parametern	<i>Levashov 1982</i>
α – CT	AOT – Isooktan, Sodium dioleyl phosphat – Isooktan	Vergleich der μE – Eigenschaften mit AOT und SDOLP sowie auf die Kinetik einer Umesterung	<i>Iskandar 1998</i>
Phosphorlipid, Hexokinase	Triton X100 – Propylbenzol, Triton X100 – Toluol	Umfassende Untersuchung des Phasenverhaltens sowie der Einflüsse auf die Aktivität, Stabilität	<i>Rodriguez 1998, Fernandez-Velasco 1998</i>
α – CT, γ -CT	AOT – Isooktan	Aufklärung der Desaktivierung (Ort, Bindung)	<i>Almeida 1998</i>

cytochrome c	Tween 85 / Span 85 – Hexan / i-Propanol	Erste Phasentransferkatalyse und Aktivitätsuntersuchung in Sorbitantensiden	<i>Ayala 1991</i>
--------------	--	--	-------------------

Ältere Zusammenstellungen über den Stand der Forschung finden sich in verschiedenen Übersichtsbeiträgen (*Luisi 1985 & 1988, Martinek 1986, Holmberg 1994 & 1997, Oldfield 1994, Stamatis 1999, Laane 1987 b*). Auffällig ist, daß das am häufigsten von Forschern verwendete Tensid das ionische Bis-ethylhexyl-sulfosuccinat (Handelsname: AeosolOT oder AOT) ist. Der Grund hierfür ist, daß das Phasenverhalten des AOT bereits gut untersucht ist (*Tamura 1979 & 1981*) und das AOT für Applikationen beim Menschen z.B. als Zusatz von Suppositorien erlaubt ist. Lebensmitteltechnisch ist es dennoch sehr bedenklich und bislang kein genehmigter Zusatz.

In den häufigsten Fällen wird das Enzym mittels der Injektionsmethode in einer Mikroemulsion solubilisiert, da hierdurch eine hohe Aktivität von Enzymen gewährleistet wird (*Ke 1998*): Hierbei werden wenige Mikroliter einer wäßrigen, konzentrierten Enzymlösung in eine Tensid/Öl -Lösung injiziert und durch starkes Schütteln (bis eine transparente, einphasige Mikroemulsion vorliegt) dispergiert. Wird das Wasser erst nach dem Dispergieren des Enzyms im organischen Lösemittel zugegeben, stellt sich teilweise keine oder nur sehr geringe Aktivität ein (*Ke 1998, Dai 1999*). Wesentlich für die Aktivität ist, neben der Wechselwirkung des Enzyms mit dem organischen Lösemittel, die Flexibilität der Proteine, welche durch die Anlagerung weniger Wassermoleküle an der Proteinoberfläche bereits gewährleistet wird (*Zaks 1988 b*). Die Injektionsmethode ist sehr schnell, hat jedoch den Nachteil, daß nicht in allen Fällen unbedingt eine thermodynamisch stabile Mikroemulsion entstanden ist - auch wenn das ternäre Phasendiagramm von Wasser-Tensid-Öl dieses für die gegebene Temperatur vorhersagt. Die entstandene Mikroemulsion kann daher in einem Zweiphasengebiet liegen, das sich jedoch erst nach Stunden der langsamen Phasentrennung zeigt. Der Grund hierfür ist, daß die Enzyme, Puffersalze und Substrate, die dem ternären System zugesetzt sind, einen ebenso großen Einfluß auf das Phasenverhalten haben: Während man von der Faustregel ausgehen kann, daß bei Verwendung nichtionischer Tenside auf zwei Gramm Tensid etwa ein Gramm Wasser in einer Mikroemulsion solubilisiert werden können (bei Tensidgehalten unter 20% und 25°C), verringert sich diese Menge bei Zugabe von gelösten Stoffen in der Wasserphase drastisch.

Bei dem in dieser Arbeit oft verwendeten Mikroemulsionssystem Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser zeigt sich der Einfluß von Makromolekülen auf das Phasenverhalten sehr deutlich (der Begriff „abgetoppt“ ist in Kapitel 7 gleich zu Beginn erläutert). So wird das Einphasengebiet bereits bei einem Anteil von 5 % Bovine Serum Albumin im wäßrigen Anteil der Mikroemulsion sehr verkleinert und verschiebt sich zu geringen Wassergehalten, wie es in der folgenden Abbildung 3.4 dargestellt ist:

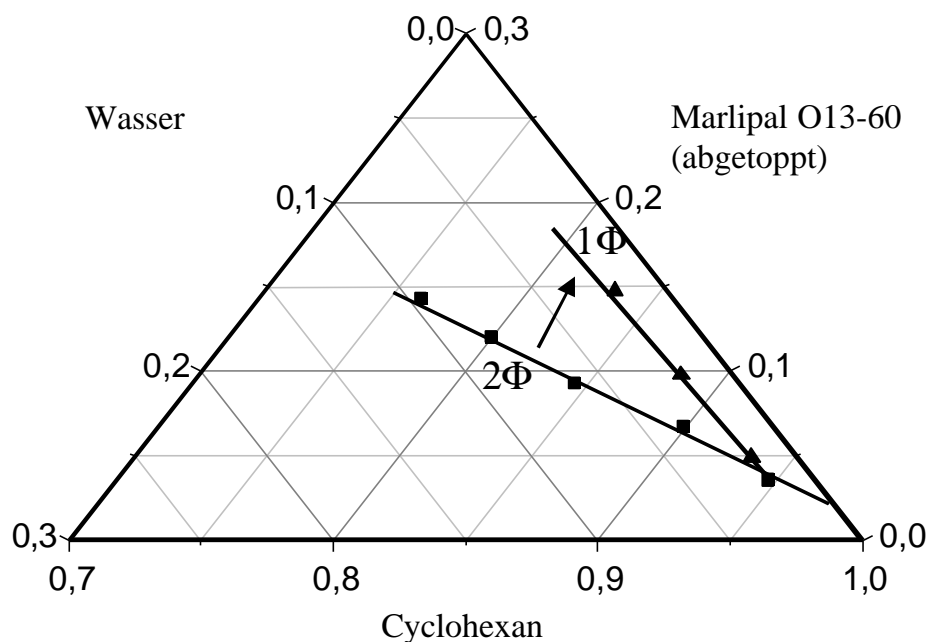


Abbildung 3.4: Ölrreiche Ecke des Gibbs'schen Phasendiagramms. Das ternäre Gemisch besteht aus Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser bei 25°C. 1Φ bezeichnet den Einphasenbereich; 2Φ beschreibt den Zweiphasenbereich. (■) zeigt die Messpunkte des reinen ternären Gemisches, bei (▲) wurde dem wäßrigen Anteil 5 Gew.% Bovine Serum Albumin zugegeben. Das vorhandene Zweiphasengebiet bei äußerst geringen Wassergehalten ($\alpha > 0,99$) konnte nicht eindeutig vermessen werden.

Eine Analyse des Phasenverhaltens der ternären Mischungen ist daher unabdingbar. Da das Phasenverhalten aus Kostengründen selten mit Enzymen durchgeführt wird, bietet das Phasendiagramm eines ternären Gemisches keine absolute Sicherheit. Sinnvoll ist es daher, wie in der Abbildung gezeigt, das Phasenverhalten mit dem Zusatz von preiswertem Bovine Serum Albumin als Ersatz für das Enzym zu untersuchen.

Alternativ zur Injektionsmethode bietet sich die Phasentransfermethode an, bei der eine Tensid/Öl-Lösung mit einer proteinhaltigen Wasserphase unterschichtet wird. Durch leichtes Rühren oder Schütteln der zweiphasigen Lösung wird das Protein langsam vollständig in die Kohlenwasserstoffphase transferiert. Anschließend wird die übriggebliebene Wasserphase von der entstandenen Mikroemulsion getrennt und Substrat der Ölphase zugegeben, das in geringen Konzentrationen weniger Einfluß auf das Phasenverhalten hat. Diese recht zeitaufwendige Methode bietet einerseits die Sicherheit ein thermodynamisches Gleichgewicht zu erlangen, andererseits auch den maximalen Wassergehalt einer Mikroemulsion zu gewährleisten.

Eine technologisch sehr interessante Anwendung ergibt sich neben der Enzymkatalyse aus den Phasentransfereigenschaften von Mikroemulsionen. Hierbei werden Zweiphasensysteme aus Wasser, Öl und Tensid verwendet, bei denen eine invers mizellare Lösung mit einer

Wasserphase im Gleichgewicht steht. Durch solche Reaktionsmedien können einfache Aminosäuren, Proteine und auch Nucleinsäuren durch die Phasentransferextraktion zwischen den beiden Phasen gezielt gereinigt, aufgetrennt oder aufkonzentriert werden (*Hayes 1997*). Aber auch denaturierte Enzyme können aufgrund der Strukturen und Oberflächenspannungen in w/o-Mikroemulsionen wieder renaturiert werden (*Hagen 1990, Hashimoto 1998*). Die folgende Abbildung 3.5 zeigt schematisch die einfachen, experimentellen Möglichkeiten bei der Verwendung des Phasentransferprozesses:

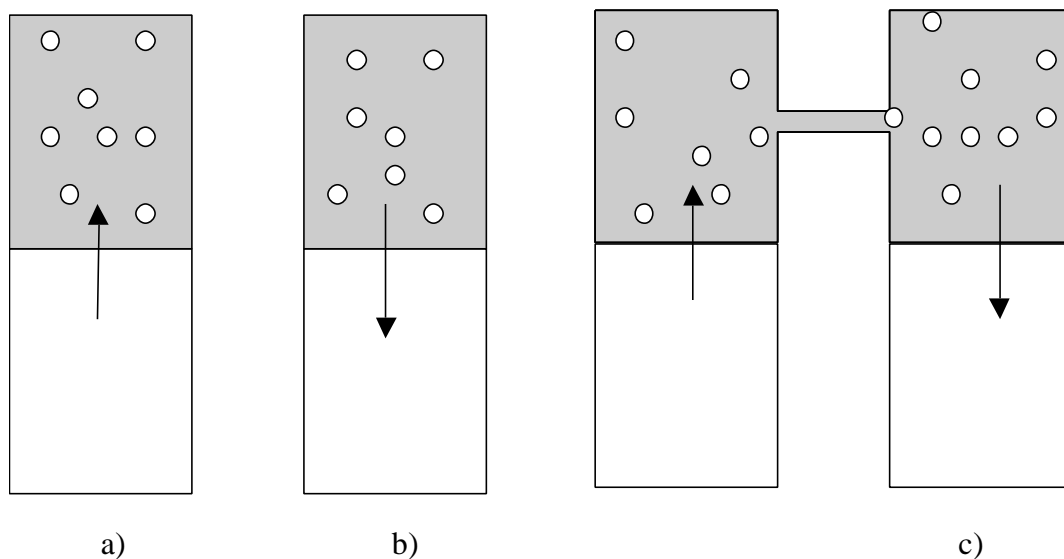


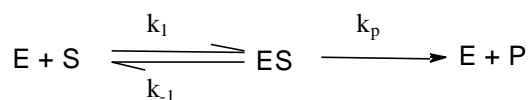
Abbildung 3.5: Mögliche Formen des Phasentransferprozesses; a) Vorwärtstransfer; b) Rückwärtstransfer; c) Doppeltransfer

Beim Vorwärtstransfer wird das Protein aus der Wasserphase in eine mizellare Lösung überführt, beim Rückwärtstransfer aus einer mizellaren Lösung wieder in eine Wasserphase (*Adachi 1997 & 1998*). Durch den Austausch der Wasserphasen ist eine Reinigung möglich, da die Löslichkeit von Molekülen in der Wasserphase sich von der invers mizellaren Lösungen unterscheiden kann. Beim Doppeltransfer wird das Protein vektoriell mit der invers mizellaren Lösung, die sich in einer Brücke befindet, von der ersten in die zweite Wasserphase überführt. In allen Fällen wird der Transport durch die inversen Mizellen bewerkstelligt. Da sich die Transportgeschwindigkeiten verschiedener Biopolymere z.B. aufgrund der unterschiedlichen Größe oder Oberflächenladungen stark unterscheidet, kann diese Methode durch gezieltes Fraktionieren zum Aufreinigen verwendet werden.

3.1.3 Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen*

Enzyme wirken auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung einer chemischen Reaktion ein. Die Aktivierungsenergie, die zur Bildung eines aktivierten Komplexes nötig ist, wird herabgesetzt. Nur bei wenigen Enzymen konnte der exakte Reaktionsmechanismus annähernd aufgeklärt werden. Es gibt jedoch verschiedene Modelle, die die Enzymkinetik durch Vereinfachungen gut beschreiben. Für die häufigsten Umsetzungen durch Enzyme hat sich die Michaelis-Menten-Kinetik etabliert (*Michaelis 1913, Lineweaver 1936*). Die theoretische Grundlage bei der Auswertung der Enzymkinetik nach Michaelis und Menten sind folgende Annahmen:

- Enzym (E) und Substrat (S) reagieren schnell zu einem Enzym-Substrat-Komplex.
- Der Komplex zerfällt entweder zurück zu Enzym und Substrat oder zu Produkt und Enzym.
- Die Reaktion zu Produkt (P) und Enzym ist irreversibel.
- Die Substratkonzentration ist sehr viel größer als die Enzymkonzentration.



k_1 und $k_{-1} \gg k_p$

Hierbei sind k_1 bzw. k_{-1} die Geschwindigkeitskonstanten des vorgelagerten Gleichgewichtes und k_p die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) zum Produkt und Enzym. Mit

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (10)$$

ergibt sich

$$r = \frac{r_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M}, \quad (11)$$

wobei K_M die Michaelis-Menten-Konstante, ein Maß für die Enzym-Substrat Affinität, ist. Für die Ermittlung der kinetischen Parameter wird die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt. In der Mehrzahl der Reaktionen, die mit

* Teile dieses Kapitels sind veröffentlicht in: B. Orlich, H. Berger, M. Lade, R. Schomäcker. Stability and activity of alcohol dehydrogenases in w/o-microemulsions: Enantioselective reduction including cofactor regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 70(6), S. 638-646
B. Orlich, R. Schomäcker. Candida Rugosa lipase reactions in nonionic w/o-microemulsion with a technical surfactant. Akzeptiert für *Enz. Microbial. Technol.* (in press)

Enzymen katalysiert werden, sind zur Reaktionsführung allerdings mindestens 2 Substrate nötig. Auch wird ein Coenzym, wie NADH, als zweites Substrat aufgefaßt. Die Michaelis-Menten-Gleichung für 2 Substrate, S_1 und S_2 , wird von der folgenden Reaktionsgleichung abgeleitet, wobei unwesentlich ist, ob zuerst S_1 oder S_2 an das Enzym angebunden wird (zufällige, bireaktante Reaktion – eine Herleitung findet sich am Ende von Kap. 7).

$$S_1 + S_2 + E \rightleftharpoons E S_1 + S_2 \rightleftharpoons E S_1 S_2 \rightarrow E + P$$

$$r = r_{\max} \cdot \frac{[S_1]}{K_{M,S_1} + [S_1]} \cdot \frac{[S_2]}{K_{M,S_2} + [S_2]} \quad (12)$$

Bei der Ermittlung der kinetischen Daten wird ein Substrat in Sättigungsmenge vorgegeben, so daß z.B. $[S_2] \gg K_{M,S_2}$. Dadurch kann ein Term der Michaelis-Menten-Gleichung zum Faktor "Eins" also aus der Gleichung eliminiert werden. Eine scheinbare "einfache" Michaelis-Menten-Kinetik ist dann gegeben.

Zu erwähnen ist hier, daß der Michaelis-Menten-Ansatz für zwei Substrate keinerlei Auskunft über den Mechanismus einer enzymkatalysierten Reaktion gibt. Es ist ein formalkinetischer Ansatz um die Reaktion zu beschreiben. Der wesentliche Vorteil der Michaelis-Menten-Kinetik ist die anschauliche Bedeutung der kinetischen Parameter, die auch zur Beschreibung realer Reaktoren ausreichend sind.

Mechanistische Modelle beschreiben die Enzymkinetik durch den Reaktionsmechanismus mit allen Teilschritten in der korrekten, zeitlichen Reihenfolge. Bei Enzymen, die zwei Substrate benötigen (z.B. Keton und Cofaktor) und zwei Produkte bilden, kommen mehrere Modelle in Frage, die sich durch die Bindungs- und Ablösereihenfolge der beteiligten Substrate und Produkte im aktiven Zentrum unterscheiden (ordered bi-bi, ping-pong (*Biselli 1995*)). In dieser Arbeit kommen aufgrund der besseren Anwendbarkeit für alle enzymkatalysierten Reaktionen der beschriebenen formalkinetische Ansatz zum Einsatz.

Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen in w/o-Mikroemulsionen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Zum einen liegen in den Mikrokompartimenten einphasiger Mikroemulsionen (d.h. in den wenige Nanometer großen inversen Mizellen, in der Tensidschicht sowie im Öl - je nach Hydrophilie der Substanz) unterschiedliche Konzentrationen vor, zum anderen wird die Kinetik durch die Eigenschaften der Mikroemulsion beeinflusst. Hierzu zählen die Art des Öles und des Tensides ebenso wie der Tensid- und Wassergehalt (Größe und Struktur der inversen Mizellen) im ternären Gemisch. Um den Vergleich mit enzymkatalysierten Reaktionen im wäßrigen Reaktionsmedium zu ermöglichen, werden die Konzentrationen der Einzelsubstanzen in einer Mikroemulsion daher immer auf das

gesamte Reaktionsmedium bezogen. Dieses führt dazu, daß die kinetischen Parameter derselben Reaktion in den unterschiedlichen Reaktionsmedien stark differieren können, auch wenn sie - wie beispielsweise die Formiatdehydrogenase-katalysierte Oxidation von Formiat - nur im wäßrigen Anteil einer Mikroemulsion stattfindet. Mögliche Einflüsse des Reaktionsmediums Mikroemulsion auf die kinetischen Parameter einer enzymkatalysierten Reaktion sollen folgend kurz erläutert werden:

Lokalisation eines Enzyms in einer Mikroemulsion

Wo sich Enzyme in einer Mikroemulsion genau befinden, ob im Innern einer inversen Mizelle oder beispielsweise an der Grenzschicht zum Öl, ist nur für wenige Proteine bislang geklärt. Grundsätzlich geht man bei den hydrophilen Proteinen vom sog. Wasserhüllenmodell aus (*Luisi 1985*). Laut diesem Modell befindet sich das Enzym in der Mitte des Wasserpools einer inversen Mizelle und ist durch eine dünne Wasserschicht vor der Tensidschicht geschützt. Indizien, wie die starke Abhängigkeit der Konformation und Aktivität der Enzyme vom Wassergehalt, sprechen für das Wasserhüllenmodell, jedoch sind auch andere Konformationen, bei denen Teile des Proteins beispielsweise im Öl vorliegen, bereits nachgewiesen (*Ramakrishnan 1983*). Bei Lipasen, die in rein wäßrigen Reaktionsmedien nur wenig aktiv sind, geht man davon aus, daß sich die hydrophoben Teile des Enzyms in der Grenzfläche zwischen Öl und Tensid befinden und sich das Enzym dadurch in einer Konformation befindet, die einen freien Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht. Dieses wird vor allem durch die starke Abhängigkeit vom w_0 - Wert deutlich.

Einfluß des Tensidgehaltes auf die Kinetik

Der Tensidgehalt einer Mikroemulsion bestimmt im Wesentlichen die Größe der inneren Grenzfläche zwischen Wasser und Öl. Die Geschwindigkeit einer Reaktion in einer Mikroemulsion kann durch die Erhöhung des Tensidgehaltes signifikant erhöht werden (*Bode 1999*). Dieses ist speziell bei Reaktionen, die an der Grenzfläche stattfinden, durch die Vergrößerung der inneren Grenzfläche nachgewiesen.

Einfluß des Wassergehaltes auf die Kinetik

Den wohl größten Einfluß auf die Kinetik von enzymkatalysierten Reaktionen in Mikroemulsionen hat der Wassergehalt einer Mikroemulsion, ausgedrückt durch den w_0 -Wert. Wie bereits erwähnt, bilden sich in w/o-Mikroemulsionen sog. inverse Mizellen. Streng genommen sind dieses nur in den seltensten Fällen sphärische Wassertropfen. Vor allem bei der Verwendung technischer, nichtionischer Tenside treten oft "Wurm-mizellen" als Aggregate auf. Für das hier vorrangig verwendete System bestehend aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser wurden durch Neutronenstreuexperimente sphärische inverse Mizellen nachgewiesen (*Lade 2000*).

Zur Erklärung der Effekte bei der Enzymkatalyse in inversen Mizellen geht man von nicht miteinander verbundenen inversen Mizellen aus. Hierbei sind zwei Bereiche zu unterscheiden, welche auch durch das Wasserhüllenmodell zur Erklärung herangezogen werden. Die Teilbereiche sind in folgender Abbildung 3.6 schematisch gezeigt:

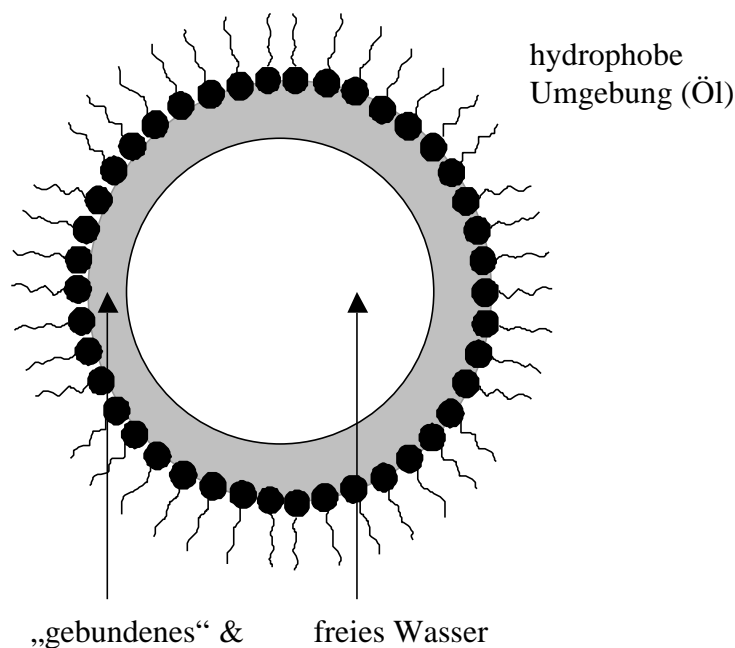


Abbildung 3.6: Schematisches Bild einer inversen Mizelle mit unterschiedlichen Wasserbereichen. Grau unterlegt ist durch Tensid "strukturiertes Wasser". Das Wasser im Innern der inversen Mizelle weist die gleichen physikalischen Eigenschaften wie freies Wasser auf.

Das Wasser im Kern einer inversen Mizelle ist teilweise an die polaren Kopfgruppen des Tensides "gebunden" und nur oberhalb einer Mindestkonzentration liegt im Kern auch "freies" Wasser vor, das sich in seinen physikalischen Eigenschaften nicht vom reinen Wasser unterscheidet. Da die inversen Mizellen bei einem Anstieg der Wasserkonzentration anschwellen (bei gleicher Tensidkonzentration bedeutet ein Anstieg der Wasserkonzentration

weniger, aber größere inverse Mizellen), liegt gerade bei niedrigen w_0 -Werten ($w_0 < 6-7$) sehr viel strukturiertes Wasser vor, welches auf die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen Einfluß hat. Besonders deutlich wird dieses bei Membranproteinen, wie Lipasen (Ruckenstein 1990, Hayes 1990, Han 1986, Stamatis 1999). Hier zeigt sich, daß ein Aktivitätsmaximum bei $w_0 < 5$ vorliegen kann, da bei diesem Maximum fast nur strukturiertes Wasser vorliegt. Die in dieser Arbeit verwendete Lipase zeigte, wie in folgender Abbildung dargestellt, das gleiche Verhalten bei geringen Wassergehalten. Die Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten Alkoholdehydrogenasen steigt dagegen mit zunehmender Wasserkonzentration stetig an. Im Falle der hier untersuchten Formiatdehydrogenase konnte dagegen keinerlei Abhängigkeit vom Wassergehalt der Mikroemulsion festgestellt werden – selbst bei unterschiedlichen Tensidgehalten ergab sich immer die gleiche Kinetik, wie in der folgenden Abbildung gezeigt ist.

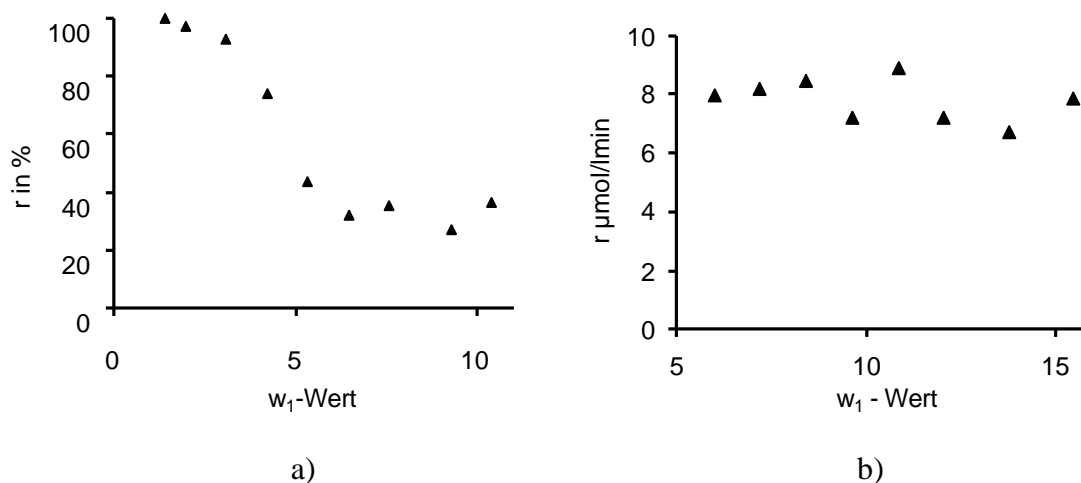


Abbildung 3.7: a) Relative Aktivität von *Candida Rugosa* Lipase b) Aktivität von Formiatdehydrogenase ($c_{\text{Enzym}} = 28 \text{ mg/l}$, Substrate in Sättigungskonz.) in einer Mikroemulsion (MarlipalO13-60 / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,15$) in Abhängigkeit vom w_1 -Wert.

Die Dielektrizitätskonstante des Wassers in inversen Mizellen kann sich, je nach w_0 -Wert, drastisch von der "freien" Wassers unterscheiden (Schomäcker 1991). Das kann auch Einfluß auf die Aktivität und Stabilität von Enzymen haben (Schomäcker 1988).

Die Größe von inversen Mizellen (die Abhängigkeit vom w_1 -Wert ist in Gl. 7 beschrieben) ändert sich bei der Beladung mit einem Enzym. Während eine enzymfreie Mikroemulsion eine sehr monodisperse Größenverteilung der inversen Mizellen aufweist, liegen bei enzymbeladenen Mikroemulsionen gleichzeitig unbeladene und mit einem Enzym beladene inverse Mizellen vor. Die Größe der beladenen inversen Mizellen verhält sich dabei unabhängig vom Wassergehalt im Verhältnis von ca. 2:1 zu den leeren inversen Mizellen

(Levashov 1982). Ein Grund hierfür liegt vermutlich in der Tatsache, daß die Enzyme gegenüber inversen Mizellen bei geringen w_0 -Werten sehr groß sind und durch die Wasserhülle die beladenen inversen Mizellen zusätzlich vergrößern. Wird der Wassergehalt sukzessive bei gleichbleibender Enzymkonzentration erhöht, kann sich die Aktivität der Enzyme durch Selbstaggregation der Biokatalysatoren verändern. Die häufigste Form der Selbstaggregation von Enzymen ist die Dimerbildung, aber auch höhere Agglomerate, bis hin zu Oktameren, konnten in w/o-Mikroemulsionen schon nachgewiesen werden (Lee 1998 b).

Wahl des Tensides

Die Art des Tensides hat unterschiedliche Einflüsse auf die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen in Mikroemulsionen. Neben dem Phasenverhalten des ternären Gemisches Öl, Tensid und Wasser ist hierbei die Unterscheidung von ionischen und nichtionischen Tensiden zu machen: Während es sich bei nichtionischen Tensiden meist um ethoxylierte Fettalkohole handelt, bei denen die Eigenschaften der inneren Grenzflächen (zwischen Mizellkern und Öl) maßgeblich durch die Länge der Ethoxylenkette bestimmt wird, baut sich bei ionischen Tensiden an der inneren Grenzfläche ein Zeta-Potential auf. Speziell durch hoch ethoxylierte Fettalkohole (EO-Grad $\gg 10$) können Lipase-katalysierte Triglyceridhydrolysen inhibiert werden, da das Enzym aufgrund der sterischen Verhältnisse an der inneren Grenzfläche nur wenig Kontakt zum Substrat bekommt (Holmberg 1994, Huang 1998). In solchen Fällen ist entweder die Verwendung eines weniger ethoxylierten Fettalkohols oder eines ionischen Tensides vorzuziehen. Zu beachten ist hierbei natürlich, daß ionische Tenside ein Enzym auch vollkommen inhibieren und denaturieren können, wie es im Falle der Formiatdehydrogenase (vollständige Inhibierung) in dieser Arbeit gezeigt wird (siehe Kap. 3.3.1).

Das von verschiedenen Forschungsgruppen am häufigsten verwendete ionische Tensid ist AOT, da das Phasenverhalten dieses Tensides sehr gut untersucht ist (Tamura 1979 & 1981). Da es sich bei AOT jedoch um einen Ester handelt, erfolgt bei Verwendung von Lipasen auch eine teilweise Hydrolyse des Tensides.

Wahl des Öles

Die in Mikroemulsionen benutzten Öle sind, mit wenigen Ausnahmen, sehr unpolar und hydrophob. Die Hydrophobie der Öle hat jedoch auch einen Einfluß auf die katalytische Aktivität der Enzyme, was zunächst nur mit den Wechselwirkungen des Öls mit den Tensiden erklärt wurde (Han 1986). Durch die ausführlichen Arbeiten von Laane et al. (Laane 1987) hat sich das log P - Konzept entwickelt, das eine gute Korrelation zwischen der Hydrophobie des

Öles und der katalytischen Aktivität vorhersagt, unabhängig vom Tensid. $\log P$ ist der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten des Öles im Gemisch Wasser/Oktanol.

So kann grundsätzlich festgestellt werden, daß bei Verwendung sehr hydrophiler Öle ($\log P < 2$) die Stabilität und Aktivität von Enzymen sehr gering ist, während sie bei $\log P > 4$ sehr hoch ist. Aliphatische Öle ($\log P > 7$) werden bevorzugt für die Enzymkatalyse in Mikroemulsionen verwendet, da sie am wenigsten Einfluß (aufgrund der schlechten Löslichkeit) auf das Wasser in den inversen Mizellen haben (*Huang 1998*).

Da Cyclohexan wegen des sehr niedrigen Siedepunktes leicht aus Mikroemulsionen zu entfernen ist, wird es sehr oft für die Enzymkatalyse in Mikroemulsionen verwendet. Alternativ hierzu bieten sich teurere, längerkettige Öle wie Heptan oder Oktan (respektive Isooktan) an, welche einen noch höheren $\log P$ - Wert aufweisen. Maßgebend ist jedoch oft das Phasenverhalten eines ternären Gemisches bei gegebenem Tensid- und Wassergehalt für die Wahl des Kohlenwasserstoffs.

3.1.4 Enzymstabilität und Produktausbeute

Denaturierung von Enzymen

Die Aktivität der Enzyme wird hervorgerufen durch die Tertiär- und Quartiärstruktur, die thermodynamisch stabile Faltung der Proteine. Die stabilisierenden Kräfte (hydrophobe Bindungen, H-H Brücken, $\text{NH}_4^+ \dots \text{CO}_2^-$) können durch äußere Einflüsse, wie einer Temperatur- oder pH-Wertänderung so geschwächt werden, daß es zu einer Auffaltung der Proteine führt. Dieses kann zu einer irreversiblen Denaturierung der Enzyme führen. Da durch die Auffaltung oft hydrophobe Bereiche der Proteine zugänglich werden, kommt es aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen zu Aggregatbildungen der Enzyme (*Zettlmeissl 1979*), so daß das Enzym nur schwer zu renaturieren ist (*Rudolph 1979*). Die Aggregation kann auch zum Ausfällen des Enzyms aus der Lösung führen. Durch die Anwesenheit von Tensid oder Öl in einer Mikroemulsion werden diese Aggregationen zusätzlich verstärkt. Neben solchen Aggregatbildungen sind chemische Modifikationen durch Oxidation, Peptidasen oder Schwermetalle maßgebende Desaktivierungsgründe. Tabelle 3.3 zeigt einen Ausschnitt verschiedener Einflußgrößen der Denaturierung von Enzymen:

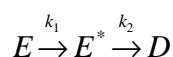
Tabelle 3.3: Einflußgrößen der Denaturierung von Enzymen

	Einfluß	Denaturierungsart	Reversibilität
physikalisch	Temperatur	partielle Entfaltung Aggregation chemische Modifikation	reversibel reversibel irreversibel
	Scherkräfte	partielle Entfaltung	reversibel
	Strahlung	chemische Modifikation	irreversibel
chemisch	H ⁺ , OH ⁻	partielle Entfaltung	reversibel
	Tenside	partielle Entfaltung	reversibel
	Oxidationsmittel	chem. Modifikation	irreversibel
	Schwermetalle	binden an SH	irreversibel
biologisch	Peptidasen	Hydrolyse der Peptidkette	irreversibel

Neben den genannten Einflüssen kann auch eine verminderte Dielektrizitätskonstante des Wassers in den inversen Mizellen zu einer beschleunigten Desaktivierung von Enzymen führen (Schomäcker 1988).

Die Kinetik der Enzymdesaktivierung in wäßrigen Reaktionsmedien ist oft erster Ordnung, daher werden für die einzelnen Anwendungen nur die Halbwertszeiten der jeweiligen Enzyme angegeben. Die biologischen Halbwertszeiten nativer Enzyme liegen weit unter 100 Tagen und sind damit meist der limitierende Faktor bei enzymtechnischen Anwendungen.

In einer w/o-Mikroemulsion ist, wie in wasserhaltigen, organischen Lösemitteln (Griebenow 1996), der stärkste Desaktivierungseffekt die partielle Auffaltung durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Tensid. Bei vielen Enzymen führt diese partielle Auffaltung daher nicht zu einer Desaktivierungskinetik erster Ordnung, sondern verläuft über eine oder mehrere reaktive Zwischenstufen. Daß die Aktivität vieler Enzyme in w/o-Mikroemulsionen zunächst innerhalb kurzer Zeit abnimmt und anschließend in ein Plateau übergehen kann, ist bereits von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Larsson 1987, Chen 1995, Skrika-Alexopoulos 1993, Carvalho 1999). Man geht davon aus, daß die Desaktivierung in einem Mehrschrittmeehanismus vonstatten geht, bei dem eine reaktive Zwischenstufe des Enzyms E* entsteht (Srinivas 1999):



Im Falle dieses Mechanismus wird die Desaktivierung wie folgt beschrieben:

$$\frac{r(t)}{r(t=0)} = A_1 e^{k_1 t} + A_2 e^{k_2 t} \quad \text{mit } A_1 + A_2 = 1 \quad (13)$$

Mittlerweile wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Stabilität von Enzymen weiter zu erhöhen. Es soll z.B. Stabilisatorzusätze (zumeist Mercaptane, welche als Reduktionsmittel wirken) vor allem die Auffaltung der Enzyme verhindert werden. Die Faltung der

Polypeptidkette wird durch die Primärstruktur, die Aminosäureabfolge, bestimmt. Um die Stabilität und Substratspezifität von Enzymen zu steigern, kann die Primärstruktur durch gezielte Mutation des Wirtes verändert werden (*Giver 1997, Clackson 1994*). Diese Methode ist jedoch aufgrund ihrer Arbeitsintensität immer stärker in den Hintergrund gerückt. So kann mit gentechnischen Methoden die Primärstruktur sehr viel gezielter verändert werden. Die Grundlage dieses "Protein-designs" ist die Kenntnis über den Zusammenhang zwischen Primärstruktur und Enzymfunktion, sowie über die Wechselwirkungen zwischen Substrat und aktivem Zentrum des Enzyms. Zu erwähnen ist hier die "Polymerase Chain Reaction" (PCR), die seit ihrer Einführung in die Enzymtechnologie 1994 (*Clackson 1994*) eine sehr gezielte molekulare Evolution zur Entwicklung und Screening (*Reetz 1998*) stabilerer und regioselektiverer Enzyme bietet (*Bornscheuer 1998, Giver 1997*).

Produktausbeute, Zyklenzahl

Die Produktausbeute enzymkatalysierter Reaktionen wird in Kilogramm Produkt pro verbrauchter Menge Enzym angegeben. Hierdurch zeigt sich besonders gut, welche Wertschöpfung durch das Enzym erreicht wurde. Um festzustellen, wieviel Enzym für einen bestimmten Umsatz eines Substrates S pro Zeiteinheit gebraucht wird, benötigt man die Raum-Zeit-Ausbeute STY (Space-Time-Yield):

$$STY = \frac{S_0 - S_t}{t} \quad (14)$$

Hierbei ist t die erforderliche Zeit für den gewünschten Stoffumsatz. Für einen wirtschaftlichen Prozeß sollten die Enzymkosten unterhalb von 5 % der Produktionskosten liegen (*Lalonde 1997*), daher ist eine hohe Produktausbeute bei hohen Raum-Zeit-Ausbeuten unabdingbar.

Bei NADH-abhängigen Enzymen ist die Nutzung des Cofaktors von entscheidender wirtschaftlicher Bedeutung. Ein Maß für die Nutzung des Cofaktors ist die Anzahl der Reaktionszyklen, die er durchläuft. Diese wird durch die Zyklenzahl ttn (total-turnover-number) ausgedrückt, d.h. durch die Konzentration des gebildeten Produktes c_{Produkt} im Verhältnis zum verbrauchten Cofaktor $c_{\text{NADH} + \text{NAD}^+}$:

$$ttn = \frac{c_{\text{Produkt}}}{c_{\text{NADH} + \text{NAD}^+}} = \frac{\text{Umsatz} \cdot c_{\text{Substrat}}}{c_{\text{NADH} + \text{NAD}^+}} \quad (15)$$

Je nach Wert des gebildeten Produktes können ttn – Zahlen über 100 bereits wirtschaftlich interessant sein. Abb. 3.8 verdeutlicht die sinkenden Cofaktorkosten bei steigenden Zyklenzahlen anschaulich.

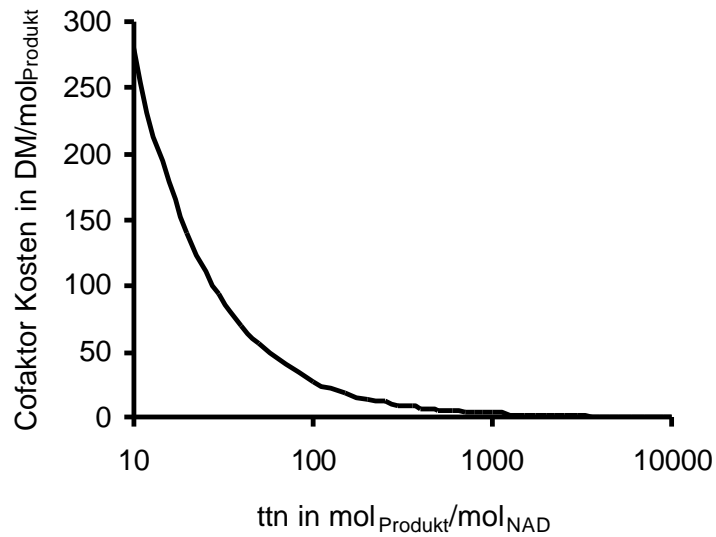


Abbildung 3.8: Produktspezifische Cofaktor-Kosten in Abhängigkeit von der Zyklenzahl ttn bei einem Großabnehmerpreis von 4,00 DM / g NAD⁺.

3.1.5 Alternativen zur Enzymkatalyse in w/o-Mikroemulsion

Für die enzymkatalysierte Synthese mit organischen Lösemitteln sind neben Mikroemulsionen verschiedene alternative reaktionstechnische Konzepte entwickelt worden, welche im Folgenden weiter erläutert werden:

Trägerfixierte Enzyme

Ganz besondere Aufmerksamkeit für den Einsatz in organischen Lösemitteln haben an Oberflächen oder in Netzwerken fixierte Enzyme gefunden, da diese in organischen Reaktionsmedien durch das im Immobilisat vorhandene Wasser aktiv und geschützt sind. Zu dieser Immobilisierung bieten sich die Adsorption an Oberflächen oder die kovalente Bindung an polymere Träger an, wofür anorganische (z.B. Glas, Ton, Sand, Metalloxide, nichtrostender Stahl) und organische Stoffe (z.B. Polysaccharide, Polyamide, Vinylpolymere) in Frage kommen (*Buchholz 1997*).

Mehrphasenreaktoren

Mittlerweile haben sich Zweiphasenreaktoren als ein geeignetes Reaktorkonzept zur Enzymkatalyse mit hydrophoben Substraten etabliert. Hierbei bilden die Substrate und Produkte eine organische Phase, während die Enzymkatalyse in der zweiten, wässrigen Phase stattfindet, in der das Substrat in einer Konzentration unterhalb der Löslichkeitsgrenze vorliegt. Da viele Enzyme an der Grenzfläche adsorbieren und dadurch denaturieren können, sind Membranverfahren für eine kontinuierliche Katalyse entwickelt worden (*Biselli 1995*). Hierbei werden die Enzyme in der wässrigen Phase zunächst durch eine Ultrafiltration separiert und die abgetrennte wässrige Phase durch eine Extraktion mit neuem Substrat versetzt, während das Produkt in die organische Phase übergeht (*Kruse 1996, Kragl 1996 b*). Ein Vorteil der Zweiphasenreaktoren liegt in der Trennung von Produkt und Enzym durch die kontinuierliche Extraktion, wodurch einer Produktinhibierung entgegengewirkt werden kann (*Liese 1996 & 1998 a, b*).

Reaktionen mit suspendierten Enzymen

Da Enzyme in hydrophoben Reaktionsmedien unlöslich sind, gibt es verschiedene Strategien, sie mit den Substraten in Kontakt zu bringen. Zum einen können tensidbeschichtete, nahezu wasserfreie Enzyme in Ölen suspendiert werden (*Kamiya 1997*), zum anderen haben sich quervernetzte Enzymkristalle in wässrigen wie auch in organischen Lösemitteln als äußerst aktiv und stabil erwiesen (*Zelinski 1997, Khalaf 1996, Persichetti 1996*). In verschiedenen Arbeiten

am Massachusetts Institute of Technology konnte sogar gezeigt werden, daß suspendierte Enzyme in organischen Lösemitteln höhere Stabilitäten als in wäßrigen Systemen zeigen (*Therisod 1986 & 1987, Klibanov 1986, Ke 1998*).

Reaktionen in MBG (Microemulsion based gel)

Eine Immobilisierungsmethode bei der Enzymkatalyse in Mikroemulsionen ist die Katalyse in Gelen, in denen die enzymhaltigen, inversen Mizellen immobilisiert werden (*Backlund 1995 & 1996, De Jesus 1995, Nagayama 1998, Fadnavis 1999*). Gegenüber dem Einschluß der Biokatalysatoren in Gelen ohne die Verwendung von Tensid oder inversen Mizellen hat die MBG-Methode keinerlei Vorteil und wird vorrangig als alternative Immobilisierungsmethode zur Ultrafiltration von inversen Mizellen erforscht. Die MBG - Methode hat den Vorteil, daß die Katalyse kontinuierlich betrieben werden kann, da die enzymhaltigen, inversen Mizellen in den Gelen fest eingeschlossen und dadurch immobilisiert sind. Reaktorkonzepte, bei denen die Gele in Pellet-form kontinuierlich von der Reaktionslösung umspült werden, haben sich bereits bewährt (*Jenta 1997*). Ein wesentlicher Nachteil der MBGs ist jedoch eine Reaktionslimitierung aufgrund des diffusiven Stofftransportes der Substrate zu den Enzymen.

Reaktionen in Flüssigkristallen

Ein ähnliches Reaktionskonzept wie die MBGs bietet die Enzymkatalyse in flüssigkristallinen Reaktionsmedien. Hierbei werden die Enzyme in der flüssigkristallinen Phase eines zweiphasigen ternären Gemisches aus Öl, Wasser und eines Tensides gehalten, während sich die Substrate in der zweiten Phase befindet (*Boy 1996 & 1998*). Der Stofftransport der Substrate zu den Enzymen im Flüssigkristall ist zwar ebenfalls diffusiv, jedoch zeichnet sich die Methode durch gute Enzymstabilitäten aus. Ein Wickelmodul für die Mehrphasenreaktion (Persönliche Mitteilung von M. Boy, TU-Gratz, Österreich 1998) hat sich in Langzeitversuchen bereits bewährt, ohne daß es zu einem nennenswerten "Ausbluten" des Enzyms aus dem Flüssigkristall gekommen ist.

Enzym – Membran - Reaktorsysteme

Enzym-Membran-Reaktoren (EMR) werden zur Immobilisierung der teuren Biokatalysatoren verwendet. Das Enzym wird hierbei durch eine Filtration in der Reaktionslösung gehalten, während entstandenes Produkt über den Permeatstrom separiert werden kann. Bei der Verwendung Coenzym-unabhängiger Enzyme kann bereits eine einfache Ultrafiltrationszelle dieser Reaktor Anforderung gerecht werden. Im Falle von Coenzym-abhängigen Biokatalysatoren

haben sich verschiedene Strategien bewährt, bei denen auch der teure Cofaktor vom entstandenen Produkt separiert werden kann. Besonders Nanofiltrationsmembranen (*Seelbach 1997, Lin 1997, Nidetzky 1996*), im Falle von polymergebundenem Cofaktor Ultrafiltrationsmembranen (*Biselli 1995, Obon 1998*), und Mehrphasenrektoren haben sich hierbei bewährt (*Yang 1995, Giorno 1995 & 1997 a, Liese 1998 a*).

Ein in den letzten 10 Jahren immer stärker in die Forschung eingehendes Konzept zur Reaktionsführung ist die direkte Immobilisierung der Enzyme an oder in der Membran durch kovalente Anbindung, Einschluß oder Adsorption (*Giorno 1997 a+b & 1996*). Dieses erstmals von der Fa. Sepracor entwickelte Konzept (*Sepracor 1989 & 1991*) soll im wesentlichen für eine kurze Kontaktzeit des Enzyms mit den Reaktanden sorgen, um Inhibierungen vorzubeugen, sowie eine Möglichkeit zur Umsetzung sehr hydrophober Substrate bieten. Das Funktionsprinzip einer dieser ersten biologisch aktiven "Reaktivmembranen" mit einem eingeschlossenen Enzym beruht beispielsweise darauf, daß auf einer Seite der Membran ein organisches, wasserunlösliches Lösemittel fließt, in dem das Enzym nicht löslich ist. Aufgrund der asymmetrischen Porenstruktur von Ultrafiltrationsmembranen ist es dem in den Poren vorliegenden Enzym nicht möglich, aus der Membran in die organische Lösung oder in das auf der anderen Membranseite fließende Wasser überzugehen. Durch die Diffusion des Eduktes von der einen Phase in die andere (vom Wasser zum Öl oder vom Öl zum Wasser) kann eine Umsetzung am Enzym in der Membran stattfinden.

Aufbauend auf den Sepracor - Ansatz haben sich mittlerweile mehrere Arbeitsgruppen mit der Immobilisierung verschiedener Enzyme an und in Membranen beschäftigt (*Uhlich 1996, Hicke 1996 & 1998, Ulbricht 1997 & 1998, Schmidt-Steffen 1992, Viswanath 1998*). Während sich die meisten Arbeiten vorwiegend mit den Grundlagen der Enzymimmobilisierung an Membranen beschäftigen und daher auch deren Reaktionstechnik nicht notwendigerweise für die untersuchten Enzym-Substrat-Systeme sinnvoll ist, haben sich Arbeiten von Ulbricht et al. stärker mit Systemen beschäftigt, für welche eine sehr kurze Kontaktzeit zwischen den Enzymen und Substraten/Produkten unabdingbar ist (*Ulbricht 1997 & 1998*). So ist die Arbeit zur Darstellung des Polysaccharids Inulin von Ulbricht et al. neben dem Sepracor - Ansatz als Enzym-Membran-Verbund zu erwähnen. Da das durch die Enzymkatalyse entstehende Polymer äußerst produktinhibierend wirkt, findet die Reaktion in freier Lösung bereits nach wenigen Sekunden nicht mehr statt, während der Umsatz und die Kettenlänge des Polysaccharids noch sehr gering sind. Aufgrund dieser Inhibierung war die enzymkatalysierte Darstellung des Inulins bislang sehr unwirtschaftlich, da das Enzym nur unzureichend katalytisch wirken konnte

(geringe STY). Durch kovalente Anbindung des Enzyms an eine konvektiv durchströmte Membran ist die Reaktion, trotz des zusätzlichen Auftretens von Membranfouling durch das Reaktionsprodukt, mit annehmbaren Ausbeuten und Polymerkettenlängen möglich.

Enzymkatalysierte, "lösemittelfreie" Synthesen

Wird anstatt eines Lösemittels eine enzymkatalysierte Umsetzung in reinem Substrat durchgeführt, so spricht man von einer supersaturierten oder lösemittelfreien Synthese (*Metzger 1998*). Ob Enzyme in reinem Substrat sowohl aktiv als auch stabil sind, hängt stark vom meist sehr geringen Restwassergehalt des Reaktionsmediums ab (*Pepin 1999*). Gute Ergebnisse konnten sowohl mit Lipasen bei der Racemattrennung von Ibuprofen (*Pepin 1999*), mit Glucosidasen (*Millqvist-Fureby 1998 a & b*) als auch bei der Darstellung von oberflächenaktiven Alkylglucopyranosiden -Zuckertensiden- (*Metzger 1998*) gezeigt werden. Die in dieser Arbeit verwendete *Yeast* Alkoholdehydrogenase ist in einer Mikroemulsion, die als Ölkomponente reines 2-Heptanon enthält (ca. 6 mol/l), ebenso noch aktiv. Jedoch ist die Stabilität der YADH in dieser Mikroemulsion nicht ausreichend, um mit reinem 2-Heptanon zu genügend hohen Umsätzen zu gelangen.

Umsetzung von Substraten in w/o-Mikroemulsionen mit ganzen Zellen aus *sacchomyces cerevisiae*

Die Reduktion prochiraler Ketone kann auch mittels ganzer Zellen erfolgen. Die Bäcker-Hefe (Baker's Yeast, *Sacchomyces cerevisiae*) ist gegenüber organometallischen Katalysatoren oder aufgereinigten Enzymen eine sehr preiswerte Alternative zur Darstellung chiraler Feinchemikalien (*Pereira 1998, Servi 1990*). So verwundert es auch nicht, daß viele Biochemiker mittlerweile der Verwendung von Hefe gegenüber Alkoholdehydrogenasen den Vorzug geben (*Turner 1994, Rissom 1999*). Obwohl die Zellwände ganzer Zellen durch viele Tenside zerstört werden können, haben sich mehrere Strategien entwickelt, Baker's Yeast auch in organischen Lösemitteln einzusetzen, um wasserunlösliche Substrate umsetzen zu können. Einerseits haben sich Ca-Alginate als sinnvolle Immobilisierungs- aber auch als Schutzmethode bewährt (*Griffin 1998, Kanada 1998*), andererseits haben sich verschiedene nichtionische Tenside als biokompatibel bei Reaktionen mit ganzen Zellen erwiesen (*Mulder 1998, Famiglietti 1992*).

Die Verwendung von ganzen Zellen in w/o-Mikroemulsionen ist eine wenig untersuchte Alternative zu wäßrigen Reaktionsmedien (*Cabral 1997, Famiglietti 1992*). Oft werden die

Zellen ohne Tensidzusatz auf Trägern immobilisiert, um sie in organischen Lösemitteln einzusetzen (Nakamura 1988).

Um die Reduktion schwer wasserlöslicher Ketone in Mikroemulsionen als Alternative zur Reduktion mit Enzymen zu untersuchen, wurden die Reduktionen von 2-Oktanon in Wasser und in einer Tween 85 / Cyclohexan / Wasser Mikroemulsion ($\gamma = 0,075$ $w_0=5,4$) untersucht. Das Phasendiagramm des ternären Gemisches stellt sich wie folgt dar:

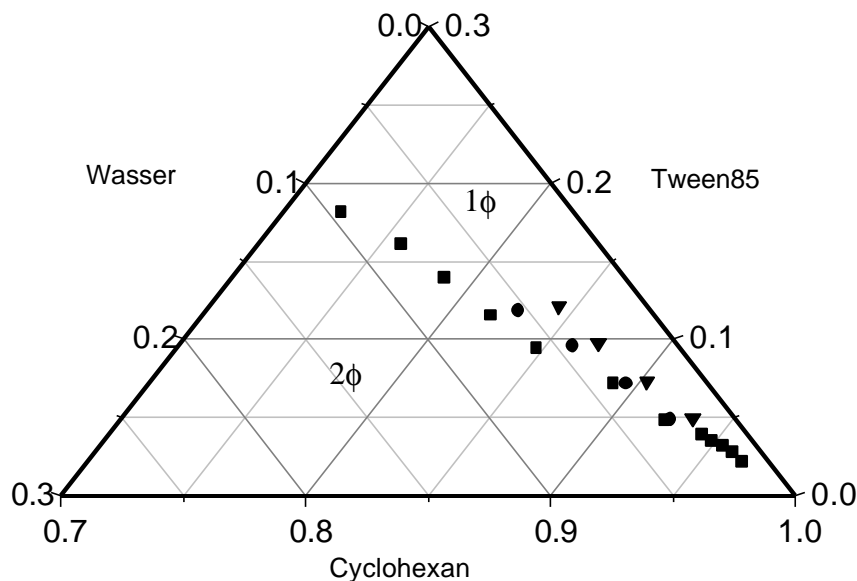


Abbildung 3.9: Öreiche Ecke des Gibbs'schen Phasendiagramms bei 37°C. Das ternäre Gemisch besteht aus Tween 85 / Cyclohexan / Wasser. 1φ bezeichnet den Einphasenbereich; 2φ beschreibt den Zweiphasenbereich. (■) zeigt die Messpunkte des reinen ternären Gemisches, bei (▲) wurde dem wäßrigen Anteil 1 Gew.% Trockenhefe, bei (△) 1 Gew.% Bovine Serum Albumin zugegeben

Die Beladung der Wasserphase (pH 7 durch 10mM Phosphatpuffer) mit Bakers-Yeast-Trockenmasse betrug hierbei 1%, das Keton lag in beiden Fällen mit 0,28 mol/l vor (zweiphasig im wäßrigen Reaktionsmedium). In den wäßrigen Phasen befand sich kein Nährmedium. Nach 24 h wurde der Umsatz von 2-Oktanon zu 2-Oktanol ermittelt. Bezogen auf die eingesetzte Trockenmasse der Hefe lag der Umsatz in der Mikroemulsion um den Faktor 130 über dem Umsatz im wäßrigen Reaktionsmedium, was auf die Löslichkeit des Ketons und das Wachstum der Hefe in der Mikroemulsion zurückzuführen ist. Da Tween 85 ein Zuckertensid ist, wird vermutet, daß es von der Hefe als Substrat angenommen wird, wodurch es zur Zellvermehrung beiträgt, wie es in Abb. 3.10 gezeigt ist.

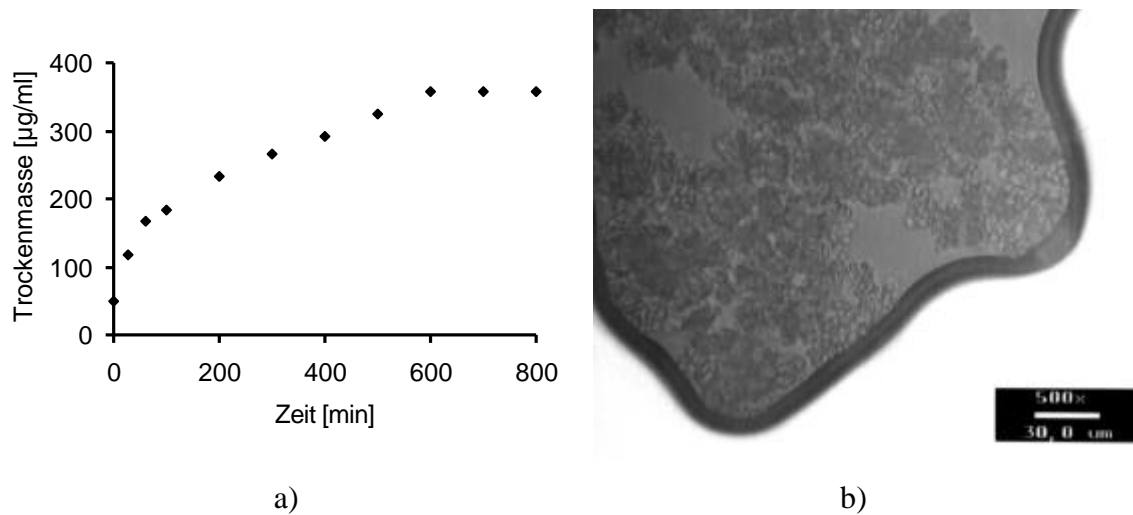


Abbildung 3.10: a) Aus der optischen Dichte bei 600 nm berechnete Hefe-Trockenmasse (Start mit 50 µg/ml) in einer Mikroemulsion aus Tween 85 / Cyclohexan / Wasser ($\gamma = 0,1$ $w_0=10$) bei 37°C mit 10mM Phosphatpuffer im wäßrigen Anteil der Mikroemulsion. Nach 10 Stunden bildeten sich große Hefe-Aggregate, welche nicht mehr detektierbar waren. b) Mikroskopische Aufnahme der Hefeaggregation in der Mikroemulsion.

3.2 Reaktionen im Enzym – Membran – Reaktor bei Verwendung von Mikroemulsionen

Auf den folgenden Seiten werden kinetische Untersuchungen an verschiedenen enzymkatalysierten Umsetzungen in w/o-Mikroemulsionen dargestellt, die für einen kontinuierlichen Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor in Frage kommen.

3.2.1 Reduktion prochiraler Ketone^{*}

Die enantioselektive Reduktion prochiraler Ketone ist aufgrund der hohen Wertschöpfung ein intensiv erforschtes Gebiet der organischen Chemie. Neben der Enzymkatalyse haben sich Reaktionskonzepte, wie die katalytische Hydrierung mit 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) Ruthenium-Katalysatoren (*Takasago 1988, Burk 1996*) oder die Boranreduktion mit Oxazaborolidinen, der sogenannten CSB-Reduktion (*Corey 1987, Giffels 1998, Rissom 1999 b, KFA-Jülich 1998*), bewährt. CSB ist eine Abkürzung nach den Autorennamen E.J. Corey, S. Shibata und K.R. Bakshi.

Zur Reduktion prochiraler, hydrophober Ketone mit Oxidoreduktasen benötigt man einen Cofaktor, wie NADH (ca. 80% aller Redoxenzyme) oder NADPH (10%). Andere Cofaktoren, wie Flavine (FAD oder FMN), Methoxatin oder Cytochrome sind vergleichsweise selten. Die Regenerierung des Cofaktors ist notwendig, da die Kosten für einen stöchiometrischen Einsatz nicht gerechtfertigt sind (z.B. 100 DM/g für NADH oder 700 DM/g für NADPH, Großabnehmerpreise liegen etwa um den Faktor 25 niedriger). Für NAD(P)H haben sich zwei Regenerierungsstrategien mit Hilfe von Enzymen bewährt:

1. Bei der substratgekoppelten Regenerierung wird die Oxidoreduktase sowohl zur Reduktion des Target-Ketons als auch zur Cofaktorregerierung eingesetzt. Dieses wird durch einen Überschuß eines Alkohols, wie Ethanol oder Isopropanol, erreicht, welcher im selben Maße oxidiert wird, wie das Target-Keton reduziert wird. Aufgrund der einfachen Handhabung dieser Methode wird sie sehr oft angewendet.

Teile dieses Kapitels wurden veröffentlicht in: B. Orlich, R. Schomäcker; Enzymatic reduction of a less water soluble ketone in reverse micelles with NADH regeneration; *Biotechnol. Bioeng.*; 1999, 65(3), 357–362
B. Orlich, R. Schomäcker; Die Ultrafiltration von w/o-Mikroemulsionen in der Biokatalyse; *Chem. Ing. Tech.*; 1999, 71(1&2), S. 156-159; B. Orlich, R. Schomäcker *Chem. Eng. Technol.*; 1999, 22(9), S. 753-757
B. Orlich, H. Berger, M. Lade, R. Schomäcker. Stability and activity of alcohol dehydrogenases in w/o – microemulsions: Enantioselective reduction including cofactor regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 70(6), S. 638-646

2. Die enzymgekoppelte Regenerierung nutzt ein zweites Enzym mit seinem Substrat zur Cofaktorregenerierung. Eines der am häufigsten eingesetzten Systeme ist die Regenerierung mit Formiatdehydrogenase aus *Candida Bodinii*, FDH, mit Formiat als Substrat. Dieses System bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem substratgekoppelten System:
- Durch die Entkopplung der Enzymaktivitäten wird zu jedem Zeitpunkt eine effektive Reduktionsgeschwindigkeit der Alkoholdehydrogenase gewährleistet.
 - Neben molekularem Wasserstoff ist Formiat eine sehr günstige Wasserstoffquelle und auch in hohen Konzentrationen in Lösung stabil sowie unbedenklich für die Enzyme und Cofaktoren.
 - Durch die Produktion von CO₂ liegt das Gleichgewicht der Reaktion sehr weit auf der Produkt (NADH)-Seite und die Aufarbeitung wird nicht durch die Produkte der angekoppelten Reaktion kompliziert.
 - Die FDH ist in großen Mengen zu günstigen Preise erhältlich und hat sich bereits im industriellen Maßstab bei der Synthese nicht natürlicher Aminosäuren bewährt.

Neben der FDH gibt es andere Cofaktorregenerierungsstrategien, die z.T. auch in Mikroemulsion untersucht wurden. So benutzte Hilhorst et al. eine Hydrogenase, welche den molekularen Wasserstoff über Methylviologen und Lipoamid-dehydrogenase auf NAD⁺ überträgt (Hilhorst 1983). Andersson et al. benutzte ganze Zellen in Verbindung mit Isopropanol zur NADH-Regenerierung für die Reduktion eines Ketons in einer Mikroemulsion (Andersson 1998). Diese alternativen Methoden zur NADH-Regenerierung in Mikroemulsionen erfordern jedoch aufgrund der Komplexität des Gesamtsystems ein erheblich höheres Maß an Regelung. Die Möglichkeit eines kontinuierlichen Prozesses ist daher sehr eingeschränkt.

Es ergibt sich für eine Reduktion mit ADH und FDH in einer Mikroemulsion folgendes, in Abb. 3.11 gezeigtes Reaktionsschema:

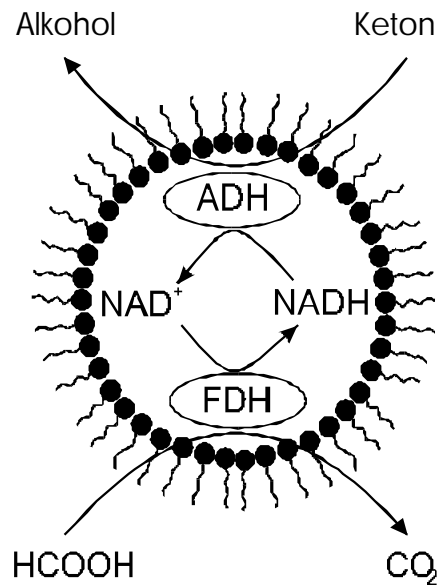


Abbildung 3.11: Das schematische Reaktionssystem der Reduktion von Ketonen mit einer Enzym gekoppelten Cofaktorregenerierung in einer Mikroemulsion

Da ionischen Tenside (AOT, CTAB, Kaliumoleat, SDS) die Formiatdehydrogenase in wäßrigen und auch nichtwäßrigen Reaktionsmedien vollständig inhibieren, wurden nichtionische Tenside zur Stabilisierung einer w/o-Mikroemulsion verwendet. Es wurden Tenside aus der Reihe der ethoxylierten Nonylphenole (Triton X100, Igepal CA 520) verwendet und auch ethoxylierte, langkettige Fettalkohole in technischer Qualität (Marlipal, Brij). Aufgrund der nahezu gleichen Aktivität und Stabilität der Formiatdehydrogenase mit diesen Tensiden, wurde im weiteren Verlauf, wegen der pseudohormonellen Wirkung der Nonylphenole (*Bolt 2000*), von einer weiteren Verwendung Abstand genommen. Der Trend zu nichtionischen Tensiden auf der Basis regenerativer Rohstoffe - weg von den multifunktionellen Nonylphenolen - hat sich mittlerweile durch die Selbstkontrolle auch in der chemischen Industrie vollzogen.

Neben der bekannten Alkoholdehydrogenase aus Bäckerhefe werden für die Ketonreduktion oft die kommerziell verfügbaren Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobazillus kefir*, *Lactobazillus brevis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Horse liver*, *Thermoanaerobium brokii* und *Candida parapsilosis* verwendet.

Formiatdehydrogenase in nichtionischen Mikroemulsionen

Um die Stabilität und Aktivität der Cofaktorregenerierung in einer Mikroemulsion zu ermitteln, mußten zunächst geeignete Tenside gefunden werden. So wurde gefunden, daß die Formiatdehydrogenase aus *Candida Bodinii* durch alle gängigen ionischen Tenside (CTAB, AOT, SDS) in Wasser und auch in w/o-Mikroemulsionen vollständig inhibiert wird, während

die Verwendung von nichtionischen Tensiden in w/o-Mikroemulsionen nur zu einer nichtkompetitiven Inhibierung führt, die unabhängig von den nichtionischen Tensiden ist (Triton X100, Brij XY, Igepal CA520, Marlipal O13-XX – siehe Kap. 7, Tab. 7.1). Diese Inhibierung läßt sich bereits bei geringen Konzentrationen der nichtionischen Tenside in Wasser ($< 0,5\%$) beobachten, ist dort jedoch nicht so ausgeprägt wie in w/o-Mikroemulsionen. Die Dielektrizitätskonstante des Wassers (20°C : $\epsilon = 81$), welche in den inversen Mizellen der w/o-Mikroemulsionen erniedrigt sein kann ($\text{C}_{12}\text{E}_5/\text{Oktan}/\text{Wasser}$; $\gamma = 0,07$ $\alpha > 90$: $\epsilon \sim 25 - 50$ Schomäcker 1991), hat keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der FDH - Katalyse. Dieses wurde durch Vorversuche in Wasser / Polyglykol – Mischungen (7:3 ; $\epsilon \sim 40$) ermittelt. Im Allgemeinen verläuft die Cofaktorregenerierung mit FDH in einer Mikroemulsion etwa um den Faktor 40 langsamer als in wäßrigen Reaktionsmedien. Um eine ausreichende Stabilität des Enzyms zu gewährleisten, erfolgten die Messungen bei 25°C . Die pH–Abhängigkeit des Enzyms verläuft analog zur Abhängigkeit in wäßrigen Reaktionsmedien, wie es in Abb. 3.12 gezeigt ist.

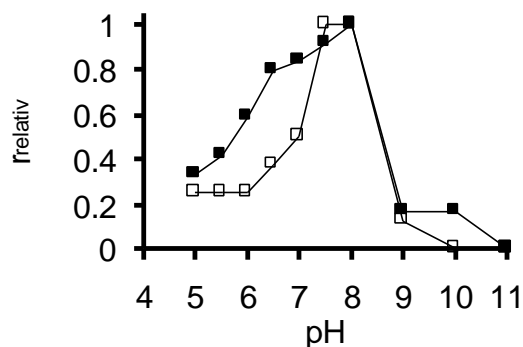


Abbildung 3.12: pH – Abhängigkeit von FDH in Wasser (□) und einer w/o-Mikroemulsion (■) bestehend aus Igepal CA 520 / (Cyclohexan + Oktan 1:1) / Wasser. Dargestellt ist die Aktivität relativ zum höchsten gemessenen Wert.

Die kinetischen Parameter der Cofaktorregenerierung lassen sich sowohl in Wasser als auch in einer Mikroemulsion nur schwer vergleichen, da sich in der Mikroemulsion aufgrund der inneren Struktur unterschiedliche lokale Konzentrationen in den Kompartimenten ergeben, sich die Parameter jedoch auf das gesamte Volumen der Mikroemulsion beziehen. In den folgenden Abbildungen 3.13 und 3.14 ist der Zusammenhang zwischen der Konzentration der Substrate und der Aktivität der Formiatdehydrogenase in Wasser und w/o-Mikroemulsion dargestellt:

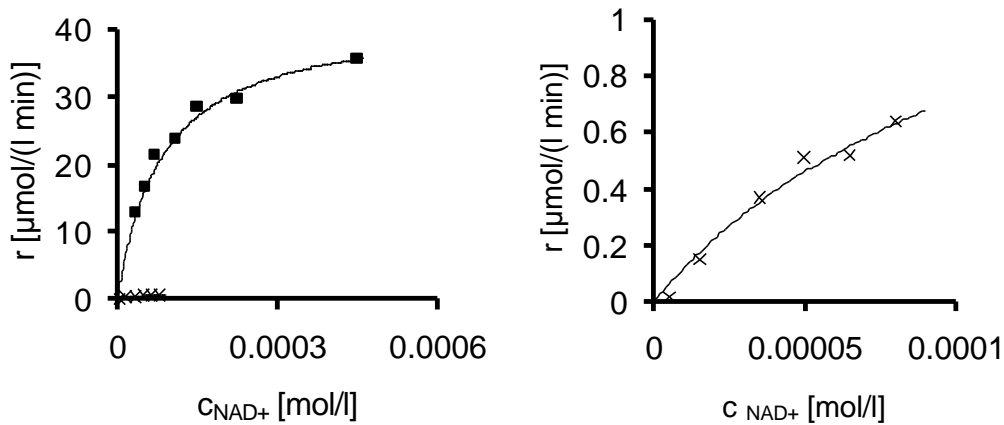


Abbildung 3.13: NAD^+ - Abhängigkeit der FDH (1,2 mg/ml) in Wasser (◻) und einer Mikroemulsion (X – rechts vergrößert) aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($\gamma=0,1$ $w_0=10$) bei pH 7 und 25°C.

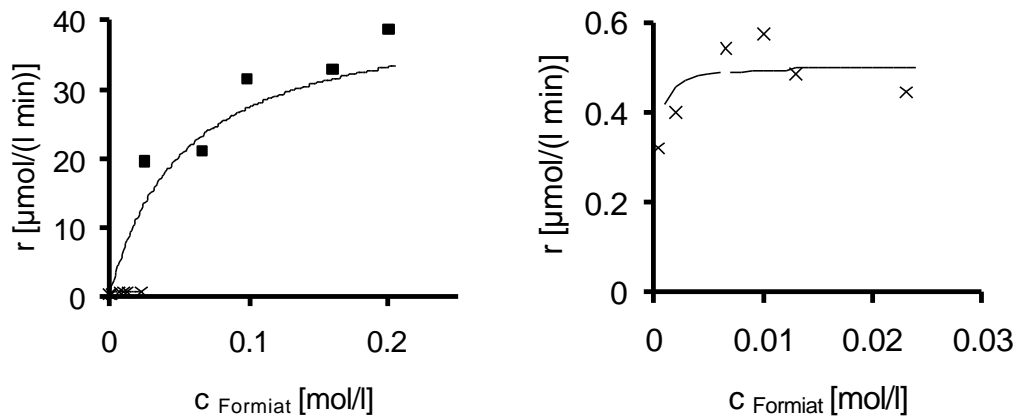


Abbildung 3.14: Formiat - Abhängigkeit der FDH (1,2 mg/ml) in Wasser (◻) und einer Mikroemulsion (X - rechts vergrößert) aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($\gamma=0,1$ $w_0=10$) bei pH 7 und 25°C.

Aus den ermittelten Aktivitäten ergeben sich durch eine Angleichung an das Michaelis-Menten-Model mittels der Origin-Software (Kuvenangleichung an eine hyperbolische Funktion) folgende kinetischen Parameter für die Cofaktorregenerierung:

Tabelle 3.4: Die kinetischen Parameter der FDH-katalysierten Cofaktorregenerierung

FDH		Wasser	Mikroemulsion
	r_{\max}	12,65 $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$	0,32 $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$
	K_{M,NAD^+}	84 $\mu\text{mol/l}$	130 $\mu\text{mol/l}$
	$K_{M,\text{Formate}}$	54 mmol/l	200 mmol/l
	$K_{i,\text{NADH}}$	35 $\mu\text{mol/l}$	50 $\mu\text{mol/l}$

Speziell bei den K_M -Werten der FDH ergeben sich ähnliche Werte wie in Wasser, wenn die Konzentrationen nur auf den wäßrigen Anteil der Mikroemulsion bezogen werden. Dieses zeigt auch, daß das NAD^+ und das NADH vollständig in den inversen Mizellen solubilisiert und für die FDH vollständig zugänglich sind. Die kinetischen Parameter sind unabhängig von den Zusammensetzungen der Mikroemulsionen, d.h. vom Tensid- und Wassergehalt und von der Wahl der verwendeten Öle (Cyclohexan, Isooktan, Oktan). Nur bei sehr geringen Wassergehalten ($w_0 < 1$) bricht auch die Aktivität der FDH ein, was dadurch erklärt wird, daß aufgrund des geringen Wassergehaltes noch keine Mikroemulsion entsteht (Mischungslücke zwischen Tensid und Öl).

Yeast - Alkoholdehydrogenase (YADH) als Biokatalysator in Mikroemulsionen

Die Hefe - Alkoholdehydrogenase (YADH) ist eines der substrat-vielfältigsten Enzyme mit hoher Stereoselektivität aus der Klasse der Oxidoreduktasen. Die Anwendung von YADH als Biokatalysator findet sich daher in vielen stereoselektiven Synthesen.

Anhand von Testreaktionen (mit Aceton und Isopropanol als Substrat) wurden zunächst die optimalen Reaktionsbedingungen der YADH in nichtionischen Mikroemulsionen ermittelt. In Abbildung 3.15 ist gezeigt, daß die Aktivität, sowohl in Wasser als auch in w/o-Mikroemulsionen, ein Maximum bei pH 7,0 - 7,3 und $T = 25 - 30^\circ\text{C}$ aufweist. Unterhalb von pH 5 war keine Aktivität zu verzeichnen. Aufgrund des starken Aktivitätsverlustes der FDH oberhalb von pH 8, sowie aufgrund der Stabilität wurden für die weiteren Messungen Standardbedingungen von pH = 7 und $T = 25^\circ\text{C}$ gewählt.

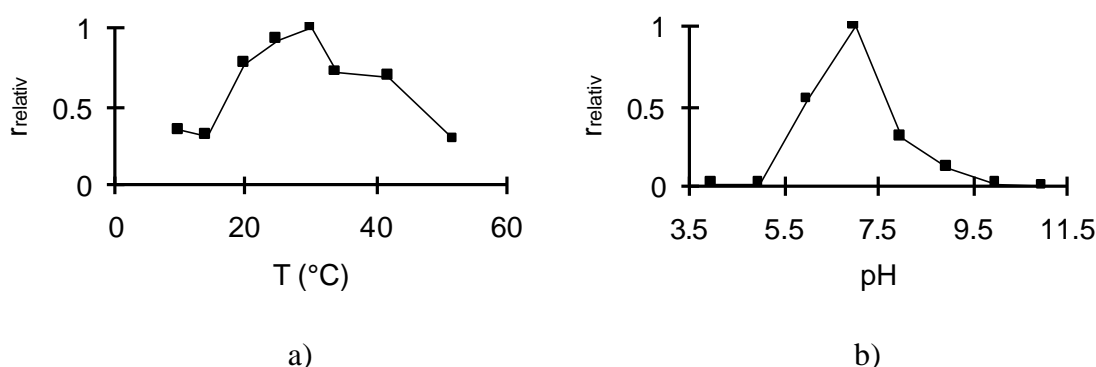


Abbildung 3.15: a) Temperaturabhängigkeit bei pH 7 b) pH – Abhängigkeit bei 25°C von YADH. Gezeigt sind die Aktivitäten in Wasser relativ zum höchsten gemessenen Wert.

2-Heptanon, ein nahezu wasserunlösliches Keton (maximale Löslichkeit in Wasser: 30mM), wurde als prochirales Keton für die Reduktion mit YADH gewählt. Das entstehende Reaktionsprodukt, S-(+)-2-Heptanol, ist ein chiraler Baustein für Synthesen und Enantiomerentrennungen und wird hauptsächlich in flüssigkristallinen Filmen als Cotensid

verwendet. Die Ermittlung der kinetischen Parameter nach Michaelis-Menten erfolgte durch die Angleichung an die in Abb. 3.16 dargestellten Messungen:

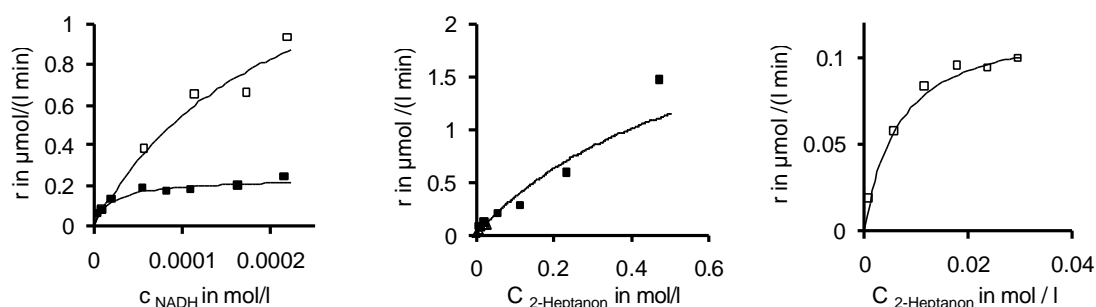


Abbildung 3.16: Kinetik der YADH (3,33 mg/ml) bei der Reduktion von 2-Heptanon in Wasser (offene Symbole) und einer Mikroemulsion (geschlossene Symbole) in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Reaktanden (Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser $w_0 = 10$ $\gamma = 0,15$)

Während sich die NADH-Affinität zur YADH in Wasser und in den Wasserkompartimenten der Mikroemulsion kaum unterscheidet, ergibt sich aufgrund des Löslichkeitunterschiedes von 2-Heptanon in den Reaktionsmedien ein großer Unterschied. So kann 2-Heptanon in einer Mikroemulsion mit YADH um den Faktor 14 schneller zum chiralen Alkohol reduziert werden, als in Wasser.

Die YADH zeigte keinerlei Inhibierung durch NAD^+ oder NADH, wurde in Wasser jedoch durch das Reaktionsprodukt 2-Heptanol inhibiert. Überraschenderweise zeigte sich diese Inhibierung in der Mikroemulsion nicht, was dadurch erklärt werden kann, das Heptanol noch weniger wasserlöslich ist und daher selbst bei hohen Konzentrationen in einer Mikroemulsion keinen Einfluß auf die YADH hat, da es vollständig im Ölanteil solubilisiert ist. Es ergaben sich folgende, in Tabelle 3.5 aufgeführte, kinetischen Parameter:

Tabelle 3.5: Die kinetischen Parameter der YADH in Wasser und einer w/o-Mikroemulsion

	Wasser	Mikroemulsion
r_{\max}	0,053 $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$	0,65 $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$
$K_{M,2\text{-Heptanone}}$	6,36 mmol/l	612 mmol/l
$K_{M,NADH}$	20 $\mu\text{mol/l}$	210 $\mu\text{mol/l}$
$K_{i,\pm 2\text{-Heptanol}}$	26 mmol/l	>1000 mmol/l

Der wesentliche Nachteil, der dazu führt, daß mit dieser Reaktion nur geringe Umsätze erreicht werden können, war die Stabilität der YADH in w/o-Mikroemulsionen. Abb. 3.17 zeigt die

relative Aktivität von YADH in w/o-Mikroemulsionen mit korrespondierenden Halbwertszeiten von wenigen Stunden:

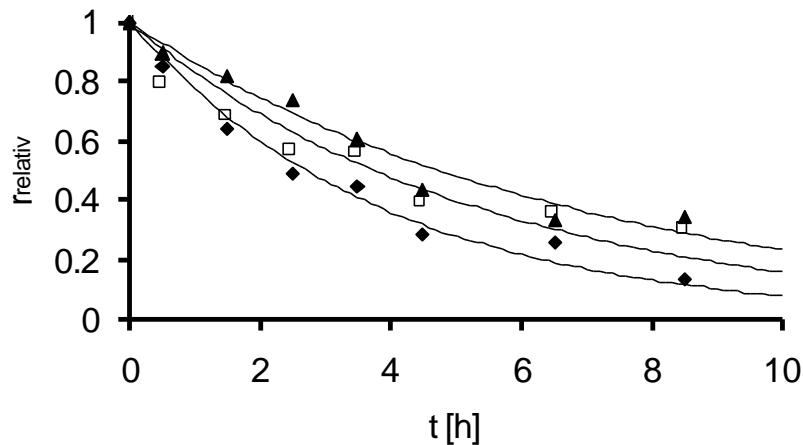


Abbildung 3.17: Stabilität der YADH in der Mikroemulsion Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($\gamma = 0,15$ $T = 25^\circ\text{C}$) bei verschiedenen Wassergehalten (\blacklozenge) $w_0 = 5$ (\square) $w_0 = 10$ (\triangle) $w_0 = 15$. Die durchgezogenen Linien sind die Anpassung an das Ein-Schritt-Desaktivierungsmodell.

Während die FDH unabhängig von der Zusammensetzung der Mikroemulsion eine etwa gleiche Stabilität wie in Wasser aufweist, ist die YADH nur wenige Stunden in einer w/o-Mikroemulsion aktiv. Die Stabilität ließ sich durch eine Erhöhung des Wassergehaltes der Mikroemulsion steigern, ist jedoch auch bei Wassergehalten nahe der Phasentrennung noch zu gering für eine sinnvolle Reaktionsführung. Eine Auswertung nach einer Ein-Schritt-Desaktivierung ergab für die Enzyme folgende, in Tab. 3.6 zusammengestellte, Desaktivierungsparameter:

Tabelle 3.6: Desaktivierung der FDH und YADH in Wasser und Mikroemulsionen Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($\gamma = 0,15$ $T = 25^{\circ}\text{C}$) unterschiedlichen Wassergehaltes

	$k [\text{d}^{-1}]$
FDH in Wasser	0,037
FDH in Mikroemulsion	0,031
YADH in Wasser	0,051
YADH in Mikroemulsion:	
$w_0 = 5$	6,117
$w_0 = 10$	4,428
$w_0 = 15$	3,499

Mit der verwendeten YADH (Fluka) konnten aufgrund der geringen Stabilität in einer Mikroemulsion keine quantitativ erfaßbaren Synthesen chiraler Bausteine vollzogen werden. Die Zyklenzahlen blieben trotz hoher Enzymbeladungen unter zwei. Trotz der geringen Umsätze konnte ein Enantiomerenüberschuß des S-2-Heptanols von $ee = 100\%$ nachgewiesen werden. Die YADH eines anderen Herstellers (Boeringer, Mannheim), die sich in flüssigkristallinen Reaktionsmedien aus nichtionischen Tensiden als äußerst stabil erwiesen hat (Boy 1996), zeigte eine ebenso geringe Stabilität und ist zusätzlich nur in geringer Konzentration im gelieferten Material (0,3 U/mg) kommerziell erhältlich.

Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) als Biokatalysator in Mikroemulsion

Die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) wurde erstmal 1993 von Peters und Kula beschrieben (Peters 1993, Kula 1996). Der Name „Carbonylreduktase“ entstand aus der Annahme der scheinbar höheren Affinität zu Reduktionssubstraten. Das Enzym, das mit einer Molmasse von etwa 78 kDa als Dimer vorliegt, hat ein besonders breites Substratspektrum. So können nicht nur Ketosäureester, sondern auch eine hohe Anzahl an aliphatischen und aromatischen Ketonen bis hin zu Diketonen, Ketoacetalen und selbst reaktive Aldehyde umgesetzt werden. Bis heute umfaßt das bekannte Substratspektrum weit über 100 Substrate. Für eine gute Aktivität der CPCR scheint ein kleiner Rest, wie eine Methylgruppe, an der einen Seite der zu reduzierenden Ketogruppe vorteilhaft zu sein, während die Größe und Art des anderen Restes keine große Rolle zu spielen scheint. Die Gewinnung des Enzyms aus einem Fermentationsansatz erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in den wesentlichen Schritten nach Peters et al. (Peters 1993) und wird im Anhang kurz beschrieben. Zu erwähnen ist noch, daß in der Gruppe von Prof. M.-R. Kula am Forschungszentrum Jülich mittlerweile an der Gewinnung einer rekombinanten Form der CPCR gearbeitet wird (Bönitz 1999).

Die Reduktion hydrophober Ketone in einer Mikroemulsion mit der CPCR wird in dieser Arbeit zum ersten mal beschrieben. Auch wenn die CPCR bei nahezu allen Ketonen eine sehr

hohe Substratspezifität (ausgedrückt durch sehr geringe Michaelis-Menten-Konstanten) hat, so ist die Verwendung von Mikroemulsionen neben Mehrphasenreaktionen (*Liese 1998*) eine sinnvolle Alternative um die Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber wäßrigen Systemen mit der *CPCR* zu erhöhen (*Rissom 1999b*). Da das Enzym ebenso NADH - abhängig ist, konnte auf das zuvor mit *YADH* verwendete Mikroemulsionssystem zurückgegriffen werden. Um für die Stabilität des Enzyms möglichst große inversen Mizellen bereitzustellen, wurde zunächst die Desaktivierung in Tween 85 / Cyclohexan / Wasser aufgezeichnet, da dieses Mikroemulsionssystem wegen der hohen Molmasse des Tween 85 (1850 g/ mol) die Bildung großer inverser Mizellen gewährleistet (*Komives 1994 a & b*). Die ermittelten Halbwertszeiten liegen in einer solchen Mikroemulsion jedoch nur im Bereich von Stunden, wie es in folgender Abbildung 3.18 gezeigt ist:

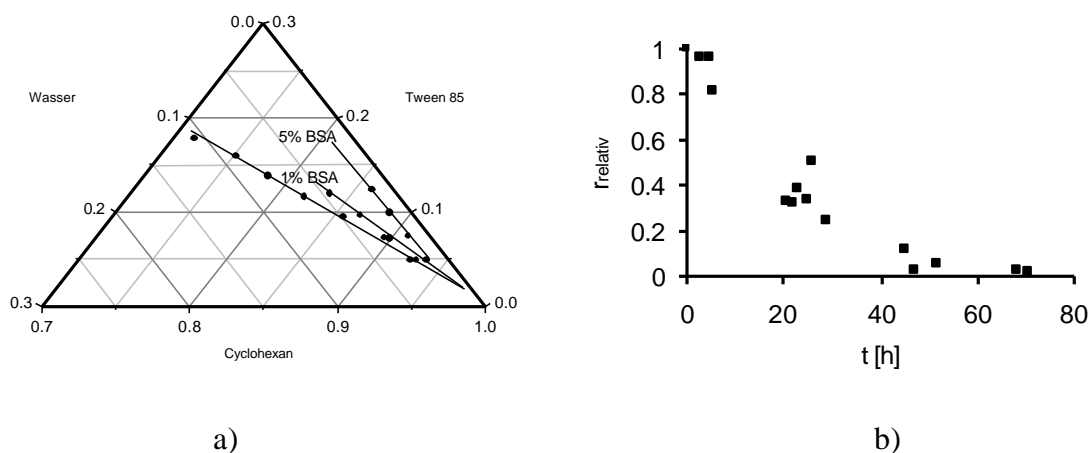


Abbildung 3.18: a) Ölrreiche Ecke des Gibbs-dreiecks des rein ternären Gemisches Tween 85 / Cyclohexan / Wasser und mit verschiedenen Gewichtsanteilen BSA im wäßrigen Anteil. Gezeigt sind die optisch ermittelten Phasengrenzen bei 25°C. b) Desaktivierung von *CPCR* in einer Tween 85 / Cyclohexan / Wasser Mikroemulsion ($\gamma = 0,05$ $w_0 = 20$). Die ermittelte Halbwertszeit liegt bei $t_{1/2} = 15,6$ h.

Für höhere und niedrigere Wassergehalte ($w_0 = 10$, $w_0 = 30$) konnte bereits nach 24 Std. keinerlei Aktivität der *CPCR* in einer Tween 85 / Cyclohexan Mikroemulsion detektiert werden. Das Tensid erwies sich daher für Umsetzungen mit *CPCR* als ungeeignet. Weitergehend wurden daher Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchungen der *CPCR* in Mikroemulsionen aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser durchgeführt. Da die Stabilität als auch die Aktivität von Alkoholdehydrogenasen sehr von den Zusammensetzungen der Mikroemulsion abhängen können, muß für eine optimale Nutzung des Enzyms dieser Zusammenhang aufgeklärt werden. Um den maximalen Aktivitäts- und Stabilitätsbereich der

CPCR in dieser Mikroemulsion zu ermitteln, wurde zunächst wie in Abb. 3.19 gezeigt bei unterschiedlichen Wasser- und Tensidgehalten die Aktivität vermessen:

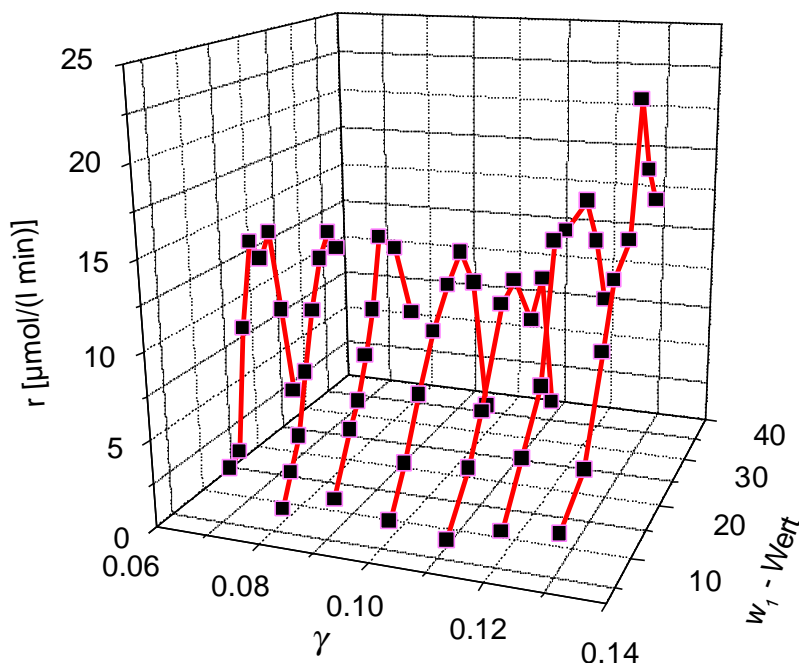


Abbildung 3.19: CPCR (0,13 mg/ml) katalysierte Reduktion von 2-Butanon (0,67 mol/l) in Abhängigkeit von den Mikroemulsionszusammensetzung (γ / w_1) des ternären Gemisches Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Wasser / Cyclohexan) bei pH 7 ($c_{\text{NADH}} = 115 \mu\text{mol/l}$).

Aus der Abb. 3.19 ist deutlich ein Ansteigen der Aktivität ab Tensidgehalten von $\gamma = 0,11$ zu erkennen. Da für die Ultrafiltration des Reaktionsmediums Rückhalte der inversen Mizellen mit NADH von 100 % gefordert sind, diese jedoch nur unterhalb $\gamma = 0,1$ zu erreichen sind, kann dieser Effekt nicht ausgenutzt werden. Sehr viel deutlicher ist die Aktivitätssteigerung mit zunehmendem Wassergehalt. Aus niedrigen Wassergehalten (ausgedrückt durch einen kleinen w_1 -Wert) resultieren sehr kleinen inversen Mizellen. In diesen Strukturen wird das Enzym wegen seiner Größe in die Grenzfläche zwischen Wasser und Öl gezwungen und die Aktivität ist sehr klein. Wird der Wassergehalt erhöht, sinkt auch der Einfluß der internen Grenzfläche und höhere Aktivitäten resultieren bis schließlich eine maximale Aktivität des Enzyms erreicht ist und ein weiteres Erhöhen des w_1 -Wertes zu einem Absinken der Aktivität führt. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten der ADH in der Mikroemulsion, insbesondere das Ansteigen und das folgende abrupte Abfallen ab einer hohen Wasserkonzentration, wurde die Viskosität des Reaktionsmedium bei 25°C vermessen (aus Kostengründen wurde anstatt der CPCR die

selbe Proteinmenge BSA verwendet). Die Änderung der Viskosität von Mikroemulsionen gibt Aufschluß darüber, ob es zu Phasenumwandlungen in dem Reaktionsmedium bei Veränderungen der Mikroemulsionszusammensetzungen kommt. So kann halbquantitativ die relative, dynamische Viskosität als Indikator für die Strukturen in den Mikroemulsionen herangezogen werden. Für die relative, dynamische Viskosität gilt nach Einstein

$$h_{rel} = \frac{h_{ME}}{h_{CH}} = 1 + \frac{5}{2} f \quad (16)$$

mit dem Volumenbruch der dispergierten Phase (Wasser und Tensid) ϕ und den Indizes für die Mikroemulsion (ME) und Cyclohexan (CH). Das Modell wurde für nicht wechselwirkende, harte Kugeln entwickelt und sagt für eine Mikroemulsion mit einem Tensidmassebruch von $\gamma = 0,1$ voraus, daß sich eine relative, dynamische Viskosität von $\eta_{rel} = 1,25$ (für $\phi = 0,1$) ergibt. Im Falle nicht-sphärischer Aggregate (z.B. bei „Wurm-Mizellen“, flüssigkristallinen Phasen oder bikontinuierlichen Strukturen) müßte die Viskosität über diesem Wert liegen (Lade 2000). Um die relative, dynamische Viskosität des Reaktionsmediums zu bestimmen, wurde ein temperiertes Kapilarviskosimeter verwendet und die Fließzeit des Reaktionsmediums durch die Fließzeit reinen Cyclohexans geteilt. Die exakte relative Viskosität ergibt sich nach

$$h_{rel} = \frac{r_{ME} \cdot t_{ME}}{r_{CH} \cdot t_{CH}} \quad (17)$$

mit den Dichten r_{ME} und r_{CH} (Indizes für Cyclohexan und Mikroemulsion), den Durchflußzeiten t . Der Dichteunterschied zwischen Cyclohexan und der Mikroemulsion ist so gering, daß er vernachlässigt werden kann.

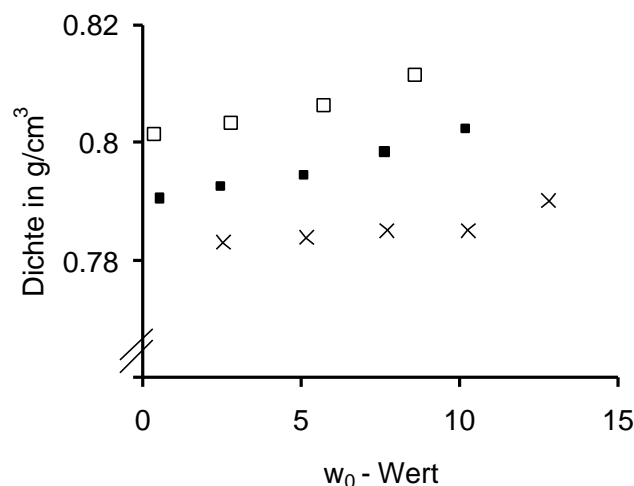


Abbildung 3.20: Dichte von w/o-Mikroemulsionen aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit unterschiedlichen Tensidgehalten (x $\gamma = 0,05$; \bullet $\gamma = 0,1$; \square $\gamma = 0,15$) und unterschiedlichen w_0 – Werten.

Aus Abb. 3.20 wird deutlich, daß die Dichte der Mikroemulsion mit geringen Tensidgehalten noch unterhalb der Dichte des reinen Cyclohexan liegt. Die Dichteunterschiede der Mikroemulsionen mit einem Tensidmassebruch von $\gamma = 0,1$ zu reinem Cyclohexan ($0,78 \text{ g/cm}^3$ bei 20°C) können bei der Berechnung der relativen Viskosität vernachlässigt werden. Die Aktivität der *CPCR*, welche mit zunehmendem w_1 -Wert stetig ansteigt und ab einem Maximum wieder abfällt, und die relative Viskosität des Reaktionsmediums ist in Abb. 3.21 gezeigt:

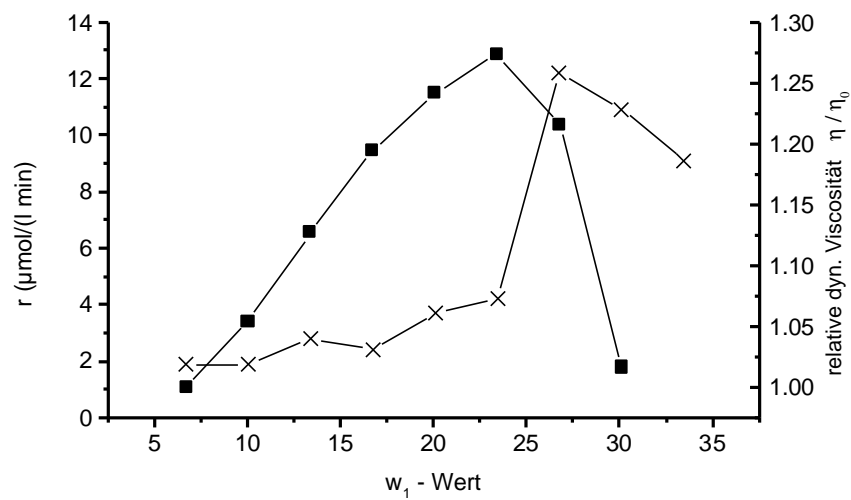


Abbildung 3.21: Aktivität (r) von *CPCR* (0,13 mg/ml, Reduktion von 0,67 mol/l 2-Butanon, pH 7, 25°C) und die relative, dynamische Viskosität (X) der Mikroemulsion Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Wasser / Cyclohexan ($\gamma = 0,1$) bei verschiedenen Wassergehalten.

Die relative, dynamische Viskosität des Reaktionsmediums liegt innerhalb des Wertebereiches, in dem sphärische Aggregate vorhergesagt werden. Das leichte Ansteigen ist damit zu erklären, daß der Wassergehalt und somit auch der Anteil der dispersen Phase ansteigt, d.h. die Mizellen werden mit zunehmendem Wassergehalt weniger, aufgrund der gleich großen Grenzfläche jedoch größer („swollen Micelles“). Durch die größeren Mizellen kommt es auch zu einer Aktivitätssteigerung der *CPCR*, da das Tensid und das Öl nicht mehr so stark mit dem Enzym wechselwirken können. Diese Beobachtungen werden durch *CPCR* Versuche in Zweiphasenmembranreaktoren bestätigt. Dabei zeigte sich, daß für die Aktivität und Stabilität des Enzyms wichtig ist, mit wieviel org. Lösemittel es direkt in Kontakt kommt (*Liese 1998 b*). Der bei hohen Wassergehalten sprunghafte Abfall sowohl der Aktivität als auch der relativen Viskosität wird mit einem zunächst nicht visuell detektierbarem Phasenübergang zu einem Zweiphasensystem erklärt. Der Übergang erfolgt hierbei in eine Mikroemulsionsphase, die im Gleichgewicht mit einer flüssigkristallinen, tensidreichen Wasserphase steht. Nur nach sehr

langen Zeiträumen (mehreren Tage) konnte das Zweiphasensystem auch visuell beobachtet werden.

Die Stabilität von *CPCR* in einer Mikroemulsion aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan ist sehr viel höher, als in Tween 85 / Cyclohexan Mikroemulsionen. Während bei geringen Tensidgehalten ($\gamma = 0,05$) ein linearer Abfall der ohnehin geringen Aktivität unabhängig vom Wassergehalt der Mikroemulsion innerhalb weniger Tage zu verzeichnen ist, können für höhere Tensidgehalte ($\gamma = 0,1$) Desaktivierungsverläufe beobachtet werden, welche durch ein Zwei-Schritt-Desaktivierungsmodell beschrieben werden. Das in Abb. 3.22 abgebildete Beispiel demonstriert deutlich das Zwei-Schritt-Modell. Hier dominiert in den ersten Stunden der Term, der mit einer Halbwertszeit von nur 4 h korrespondiert. Sein Einfluß ist damit schon nach einem Tag praktisch vernachlässigbar, und der zweite Term mit einer korrespondierenden Halbwertszeit von 67 h bestimmt den weiteren Verlauf.

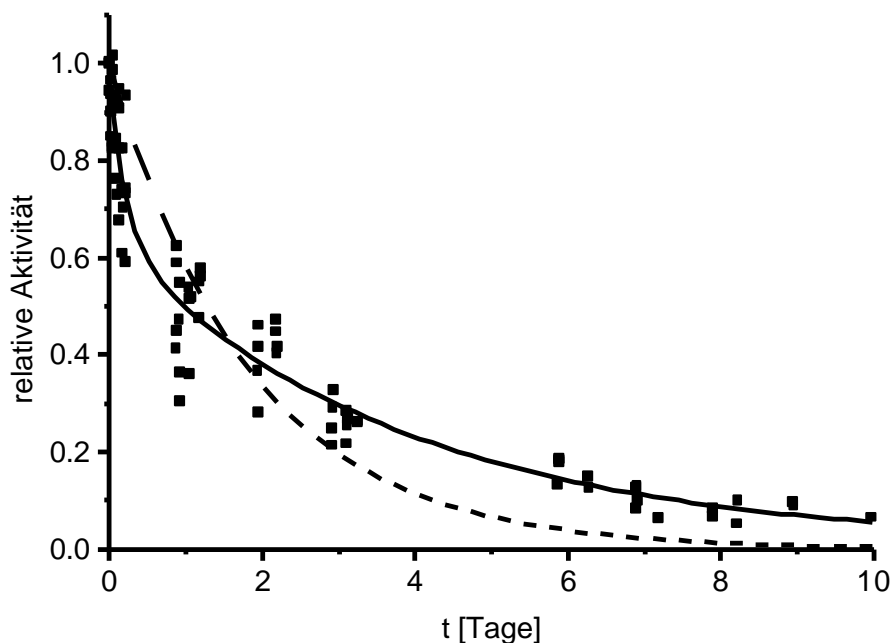


Abbildung 3.22: Desaktivierung von *CPCR* in einer Mikroemulsion (Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Wasser / Cyclohexan) mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 5$. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung nach dem Zwei-Schritt-Modell mit den Parametern $A_1=0,63$ $A_2=0,33$ $k_1=0,249 \text{ d}^{-1}$ $k_2= 4,32 \text{ d}^{-1}$ (die gestrichelte Linie zeigt die Anwendung des Ein-Schritt-Modells).

Die Michaelis-Menten-Konstanten für Reduktionsreaktionen ließen sich in Mikroemulsionen nicht ermitteln, da es NADH–abbauende Nebenreaktionen der *CPCR* gibt (Rissom 1999 a), die

die Reduktion des Ketons in einer Mikroemulsion überlagern. Die Nebenreaktionen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es kann jedoch festgestellt werden, daß die NADH–abbauende Komponente sich in der Enzymstammlösung befindet. Die Nebenreaktionen treten in einer Mikroemulsion sehr viel stärker auf, da sich das Enzym / NADH–System in den inversen Mizellen befindet, und daher die lokalen Konzentrationen sehr viel höher als in der wäßrigen Lösung sind. In Wasser tritt der Effekt ebenso auf, es können jedoch alle kinetischen Daten der Reduktionsreaktionen der *CPCR* ermittelt werden. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei der Reduktion von 2-Oktanon und 2-Butanon in einer Mikroemulsion die gleiche wie in Wasser ist. Da diese maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten gleich sind, wird angenommen, daß dieses auch für die Michaelis-Menten-Konstante gilt, welche in Wasser trotz der Nebenreaktion der *CPCR* zuverlässig zu ermitteln ist:

Tabelle 3.7: Kinetische Daten der *CPCR* in einer Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser Mikroemulsion mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 5$; die K_M -Werte wurde durch Messungen in wäßrigen Reaktionsmedien ermittelt.

Parameter	Wert
$K_{M,NADH}$	$1,0 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$
$r_{\max,2\text{-Butanon}}$	$0,026 \pm 0,003 \text{ U/mg}$
$K_{M,2\text{-Butanon}}$	$100 \pm 40 \text{ } \mu\text{mol/l}$
$r_{\max,Aceton}$	$0,076 \pm 0,003 \text{ U/mg}$
$r_{\max,Acetophenon}$	$0,047 \pm 0,002 \text{ U/mg}$
$r_{\max,2\text{-Oktanon}}$	$0,052 \pm 0,002 \text{ U/mg}$
$K_{M,2\text{-Oktanon}}$	$21 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol/l}$
k_1	$0,249 \pm 0,026 \text{ d}^{-1}$
k_2	$4,32 \pm 1,30 \text{ d}^{-1}$
A_1	$0,63 \pm 0,04$
A_2	$0,33 \pm 0,04$

Aufbauend auf die kinetischen Daten der 2-Butanon-Reduktion mit der *CPCR* und der Cofaktorregenerierung durch FDH wurde ein Feed-Batch Versuch geplant. Hierbei wurde der pH – Wert der inversen Mizellen durch einen Indikator gemessen, um den Fortschritt der Reaktion zu detektieren. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Wellenlängen der Absorptionsmaxima und die Azidität der funktionellen Gruppen von Indikatoren sich in Mikroemulsionen von denen in reinem Wasser unterscheiden können (*Seoud 1989, Zhou 1997*). Dieses trifft, wie aus folgenden Abbildungen zu erkennen ist, auf die verwendete Mikroemulsion ebenso zu.

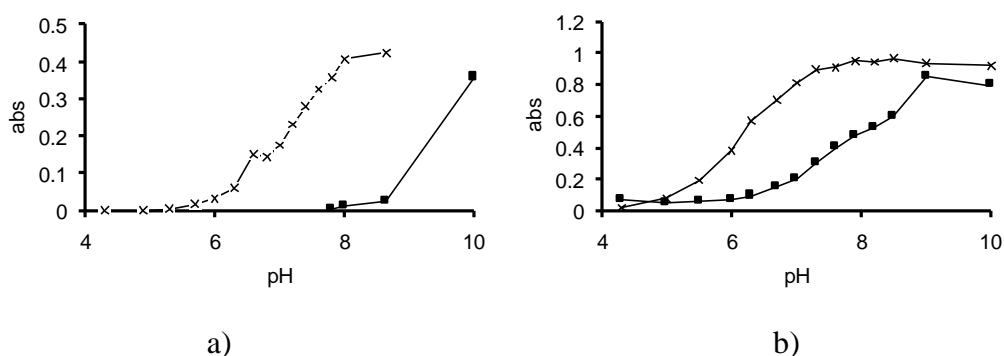


Abbildung 3.23: a) Absorption von Bromthymolblau (6,7 mg/l) in Wasser (X Abs_{Max} bei 616 nm) und einer Mikroemulsion aus O13-60 (abgetoppt)/ Cyclohexan / Wasser Mikroemulsion mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 5$ (◼ Abs_{Max} bei 626 nm). b) Absorption von Bromkresolpurpur (3,3 mg/l) in Wasser (X Abs_{Max} bei 589 nm) und einer Mikroemulsion aus O13-60 (abgetoppt)/ Cyclohexan / Wasser Mikroemulsion mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 5$ (◼ Abs_{Max} bei 599 nm).

Da das Bromkresolpurpur in einer Mikroemulsion einen nahezu linearen Umschlagsbereich im pH-Bereich von 6,5 bis 7,5 aufweist, wurde es zur pH-Detektion verwendet.

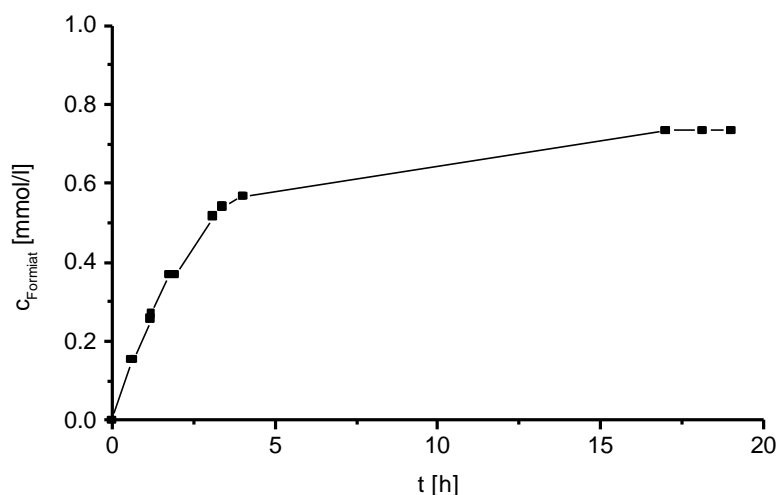


Abbildung 3.24: Formiatverbrauch bei der Reduktion von 2-Butanon (1mM) in einer Mikroemulsion aus Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,1$ und $\alpha = 0,97$ ($w_1 = 5$). $CPCR = 0,13$ mg/ml, $FDH = 0,26$ mg/ml, $NADH = 30$ $\mu\text{mol/l}$, $\text{Na-CO}_2\text{H}$ (start) = 4,9 mmol/l.

Aufgrund der Stabilität der $CPCR$ liegt der Umsatz der Reduktion nach 20 Stunden gerade bei 73 %. Trotzdem ist noch eine Restaktivität des Enzyms vorhanden. Die Reaktion läßt sich jedoch nach 24 h nicht weiter über den pH-Wert verlässlich verfolgen, da das Bromkresolpurpur in Anwesenheit des Tensides instabil ist. Das Reaktionsprodukt wurde durch Gaschromatographie mit einem Enantiomerenüberschuß von $ee = 100$ % identifiziert. Die total-turnover-number des Cofaktors betrug $tn = 22$.

Horse Liver Alkoholdehydrogenase als Biokatalysator in Mikroemulsion

Die aus unterschiedlichen Quellen gewonnenen Alkoholdehydrogenasen unterscheiden sich stark in ihrem Substratspektrum und ihren katalytischen Eigenschaften. Die ADH aus *Horse Liver* ist aufgrund ihres engen Substratspektrums nur wenig in organischen Medien untersucht. Sie wird im wesentlichen zur Oxidation primärer Alkohole (Snijder-Lambers 1991) oder zur Cofaktorregenerierung (Larsson 1990), weniger jedoch für synthetische Zwecke - z.B. zur Synthese weniger Spezialchemikalien, wie der Reduktion zyklischer prochiraler Ketone und Steroide mit 3 β -Hydroxylgruppen (Larsson 1987) - verwendet. Das größte Hindernis zur Verwendung von *HLADH* in Mikroemulsionen stellte bislang die geringe Stabilität dar. So wurden in verschiedenen Mikroemulsionen Halbwertszeiten des Enzyms von nur wenigen Stunden (Lee 1987, Snijder-Lambers 1991) oder sogar nur wenigen Minuten (Samara 1987) nachgewiesen. Abhilfe könnte hier die Entwicklung Cofaktoren-gebundener Enzymkristalle aus *HLADH* (Cofactor-bounded-CLEC) schaffen, die sich durch eine hohe Stabilität und Aktivität im Vergleich zum reinen Enzym auszeichnen (Clair 2000). Ein weiterer Nachteil der *HLADH* ist die geringe kommerzielle Verfügbarkeit. Die vorhandenen Anbieter, wie Fluka oder Sigmam, haben *HLADH* nur in geringer Reinheit und Konzentration (Ethanol: 0,3 U/mg) vorrätig. Für Synthesen in Mikroemulsionen sind jedoch Konzentrationen über 10 U/mg in möglichst hohen Reinheiten wünschenswert.

Über hohe *HLADH*-Stabilitäten in einer auf AOT-basierenden Mikroemulsion wurde von Larsson et al. berichtet. Als bestes Ergebnis wurde ein Aktivitätsverlust von rund 75 % innerhalb von 48 h detektiert. Anschließend nahm die Aktivität in der AOT - Mikroemulsion über Tage hinweg nicht weiter ab, so daß die *HLADH* in der Mikroemulsion auch für präparative Umsetzungen mit geringen Substratkonzentrationen genutzt werden konnte (Larsson 1987).

Um den maximalen Aktivitäts- und Stabilitätsbereich der *HLADH* in der Mikroemulsion zu ermitteln, wurde analog zur Untersuchung der *CPCR* bei unterschiedlichen Wasser- und Tensidgehalten die Aktivität vermessen. Aufgrund der Ergebnisse für *CPCR* wurde für *HLADH* auf Tests mit Tween 85 verzichtet. Abb. 3.25 zeigt die Aktivität der *HLADH* bei der Reduktion von 2-Butanon in Mikroemulsionen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen.

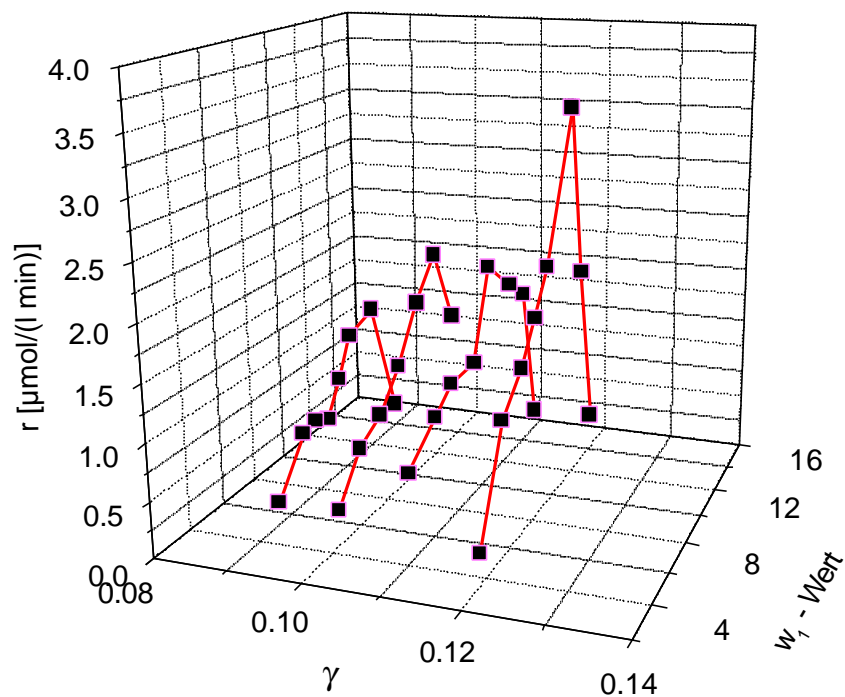


Abbildung 3.25: *HLADH* (0,0375 mg/ml) katalysierte Reduktion von 2-Butanon (0,67 mol/l) in Abhängigkeit von den Mikroemulsionszusammensetzung (γ / w_1) des ternären Gemisches Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Wasser / Cyclohexan) bei pH 7 ($c_{\text{NADH}} = 115 \mu\text{mol/l}$).

Der Verlauf der Aktivität der *HLADH* innerhalb dieser Kurvenschar ist ähnlich der *CPCR*-Aktivität bei der Reduktion von 2-Butanon. Analog hierzu wurde deshalb die Viskosität des Reaktionsmediums gemessen, um festzustellen, ob sich ebenso ein Abfall der Viskosität bei hohen Wassergehalten ergibt:

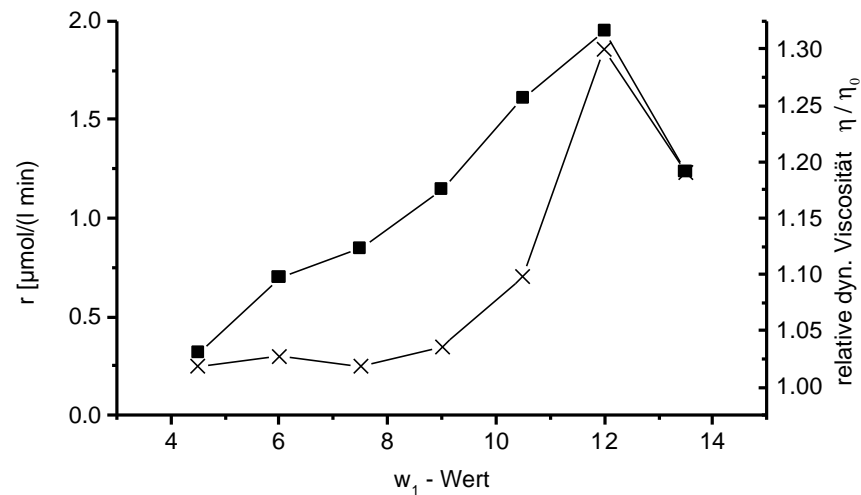


Abbildung 3.26: Aktivität (\blacksquare) von *HLADH* (0,0375 mg/ml, Reduktion von 0,67 mol/l 2-Butanon, pH 7, 25°C) und die relative dynamische Viskosität (\times) der Mikroemulsion Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Wasser / Cyclohexan ($\gamma = 0,1$) bei verschiedenen Wassergehalten.

Der Abfall der Aktivität bei höheren Wassergehalten wird auch hier durch den visuell schwer detektierbaren Übergang in ein Zweiphasensystem erklärt, während der Anstieg bei geringeren Wassergehalten ($w_1 = 4 - 12$) durch das Anschwellen der Mizellen, analog zu den Beobachtungen bei der *CPCR*, gedeutet wird.

Obwohl sich der Verlauf der Aktivitäten von *CPCR* und *HLADH* in den unterschiedlichen Zusammensetzungen der Mikroemulsionen sehr ähnlich verhalten, ist bei der Stabilität dieser beiden Enzyme ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Eine deutlich bessere Stabilität als für die *CPCR* konnten unter identischen Bedingungen ($\gamma = 10$, $w_0 = 10$) mit *HLADH* in Mikroemulsionen auf Marlipal-Basis erzielt werden.

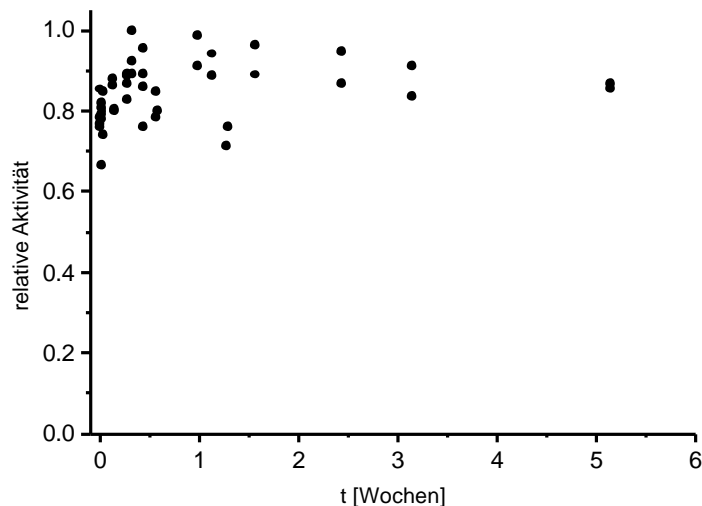


Abbildung 3.27: Desaktivierung von *HLADH* in einer Mikroemulsion (Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Wasser / Cyclohexan) mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 10$. Die Aktivität wurde auf den höchsten gemessenen Wert bezogen.

Um sicherzustellen, daß es sich bei den in Abb. 3.27 dargestellten Messungen zur Bestimmung der Enzymstabilität wirklich um einen Enzym-katalysierten NADH-Abbau handelt, wurde nach 5 Wochen die Lösung für 20 min auf 65°C erhitzt (beschleunigte Denaturierung) und nachfolgend die Aktivität erneut gemessen. Es wurde ein Absinken der Aktivität auf ca. 30 % des Anfangswertes festgestellt.

Von der guten Stabilität der *HLADH* in der Mikroemulsion ausgehend wurden die kinetischen Parameter für Reduktionsreaktionen mit verschiedenen Substraten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 wiedergegeben:

Tabelle 3.8: Kinetische Daten der *HLADH* in einer Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser Mikroemulsion mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 5$

Parameter	Wert
$K_{M,NADH}$	$6 \pm 1 \mu\text{mol/l}$
$r_{\max,2\text{-Butanon}}$	$(23 \pm 3) 10^{-3} \text{ U/mg}$
$K_{M,2\text{-Butanon}}$	$< 0,1 \mu\text{mol/l}$
$r_{\max,Aceton}$	$(50 \pm 5) 10^{-3} \text{ U/mg}$
$r_{\max,2\text{-Oktanon}}$	$(6 \pm 1) 10^{-3} \text{ U/mg}$
$r_{\max,Acetophenon}$	$(10 \pm 1) 10^{-4} \text{ U/mg}$
$r_{\max,i\text{-Butylmethylketon}}$	$(8 \pm 2) 10^{-3} \text{ U/mg}$
$K_{M,i\text{-Butylmethylketon}}$	$73 \pm 35 \text{ mmol/l}$
$k_1 = k_2$	stabil ($< 10^{-2} \text{ d}^{-1}$)

Um zu ermitteln, ob sich die Stabilität des Enzyms auch in einem Feed-Batch Prozeß bewähren würde, wurde die Reduktion von Aceton über einen Zeitraum von einem Monat beobachtet. Den ungepufferten Mikroemulsionen mit *HLADH* und *FDH* wurde Bromkresolpurpur zur photometrischen Messung des pH-Wertes zugesetzt. Beim Überschreiten von $\text{pH} = 7,3 - 7,5$ wurde die Mikroemulsion mit Ameisensäure auf $\text{pH} = 6,5 - 6,8$ zurücktitriert. Die Änderung des pH-Wertes wurde in diesem pH-Bereich als linear mit der Änderung der Ameisensäurekonzentration korreliert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.28 dargestellt:

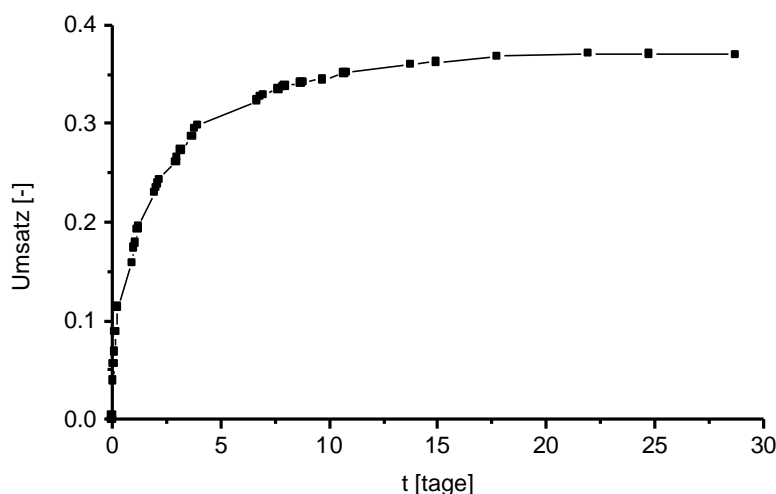


Abbildung 3.28: Reduktion von Aceton (67 mM) in einer Mikroemulsion aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,1$ und $w_0 = 10$. *HLADH* = 0,135 mg/ml, *FDH* = 0,47 mg/ml, NADH = 30 $\mu\text{mol/l}$, Na- CO_2H (start) = 4,9 mmol/l. Dargestellt ist der aus dem Formiatverbrauch berechnete Umsatz.

Nach 30 Tagen konnte keine Veränderung des pH-Wertes mehr festgestellt werden. Dieses lag daran, daß aufgrund der Instabilität des pH-Indikators keine verlässliche Aussage mehr über den pH-Wert gemacht werden konnte. Die total-turnover-number dieses Versuches lag bei $\text{ttn} = 2029$.

Um in realisierbarer Zeit reproduzierbare Reduktionen prochiraler Ketone zu gewährleisten, wurden weitere Feed-Batch Versuche mit geringeren Konzentrationen an 2-Butanon durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, daß bereits nach drei Tagen der Indikator Bromkresolpurpur durch das Tensid in seinen Eigenschaften so verändert wird, daß keine verlässliche pH-Analytik mehr möglich ist. Die Versuche wurden daher so konzipiert, daß innerhalb eines Tages ein voller Umsatz zu realisieren war, wie es der in Abb. 3.29 dargestellte Versuch ergab.

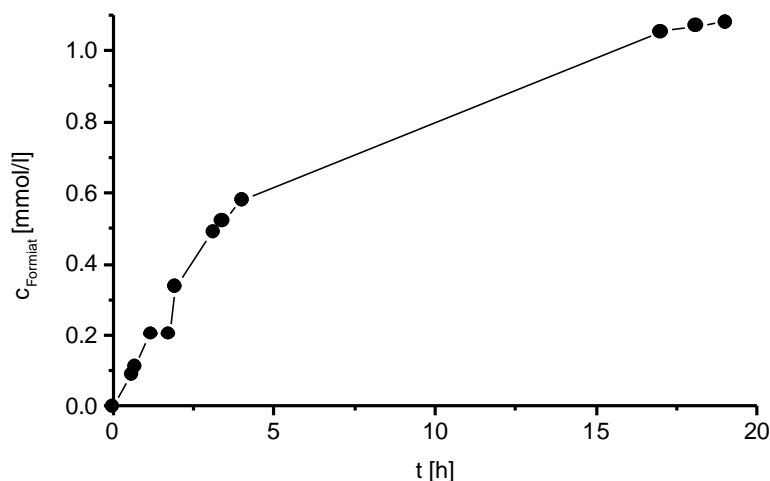


Abbildung 3.29: Formiatverbrauch bei der Reduktion von 2-Butanon (1mM) in einer Mikroemulsion aus Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,1$ und $\alpha = 0,97$ ($w_1 = 5$). HLADH = 0,26 mg/ml, FDH = 0,26 mg/ml, NADH = 30 μ mol/l, Na-CO₂H (start)= 4,9 mmol/l.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Reduktion (bis 5 h) bestätigt die zuvor gemessenen kinetischen Parameter. Die t_{tn} dieser Reduktion war 30, was jedoch aufgrund der geringen Substratkonzentration als exemplarisch für die Cofaktorregenerierung mit FDH gelten kann. Der Umsatz von 100 % bei einem Enantiomerenüberschuß von $ee = 100$ % konnte durch GC verifiziert werden.

3.2.2 Racemattrennung mittels Lipase^{*}

Die klassische Racematspaltung beruht auf der Reaktion eines Racemats mit einem Enantiomer einer chiralen Substanz als Trennreagenz. Das durch die Verbindung entstandene 1:1 Gemisch von Diastereomeren kann dann mittels fraktionierter Kristallisation getrennt werden (*Collet 1998*). Dieses Verfahren, von L. Pasteur entdeckt (*Pasteur 1848*), wird noch heute beispielsweise zur Darstellung von S-Naproxen im Tonnenmaßstab pro Tag durchgeführt. Der Nachteil der Racematspaltung gegenüber der Darstellung aus prochiralen Verbindungen liegt immer in der Tatsache, daß das zweite Enantiomer als Nebenprodukt anfällt und der Umsatz daher nicht über 50 % liegen kann. Neue Reaktionskonzepte, bei denen das zweite Enantiomer in einem weiteren Prozeßschritt wieder racemisiert wird, werden in der Zukunft daher an Bedeutung gewinnen (*Strauss 1999, Kroutil 1998*).

^{*} Teile dieses Kapitels wurden veröffentlicht in: B. Orlich, R. Schomäcker. Candia Rugosa lipase reactions in nonionic w/o-microemulsion with a technical surfactant. Akzeptiert für *Enz. Microbial. Technol.* (in press)

Lipasen weisen deutlich verschiedene Spezifitäten auf. Es gibt Lipasen, wie die aus *pig pancreas* (PPL) gewonnene, die relativ unspezifisch an allen Positionen spaltet, oder aus *Candida rugosa* (CRL), welche für wenige Substrate hochspezifisch ist und auch hochselektive Lipasen, die bevorzugt an einer bestimmten Position spalten, wie die von *Chromobacterium viscosum* (CVL) oder *Rhizopus arrhizus* (RAL).

Zur Vorhersage der bevorzugt umgesetzten Form eines chiralen Substrates gibt es von Cygler et al. eine empirische Regel für sekundäre Alkohole, die für viele Lipasen und Esterasen gilt (Cygler 1994, Zuegg 1997, Bornscheuer 1999). Diese Regel besagt, daß das in Abb. 3.30 dargestellte Enantiomer bevorzugt wird, wenn "R1" ein Substituent mittlerer Größe ist, typischerweise drei Kohlenstoffatome lang, und "R2" ein größerer Substituent, typischerweise fünf Kohlenstoffatome lang, der auch verzweigt sein kann (Benzonana 1971). Der Übergangszustand bei einer Lipase-katalysierten Reaktion ist nahezu bei allen Lipasen gleich (dargestellt in Abb. 3.30).

Eine Erklärung dieser Regel durch Cygler et al. basiert auf der relativen Größe der Substituenten am Stereozentrum. Sie erklären die Selektivität anhand von Röntgenstrukturen von Enzym-Substrat-Komplexen mit kovalent eingebauten Inhibitoren, die als Substratanaloga den Übergangszustand imitieren. Sie benutzten dazu die Lipase aus *Candida rugosa* mit Enantiomeren des Menthols. Mittlerweile hat sich die Regel durch empirische Untersuchungen auch für andere Substrate bestätigt (Angelis 1998). Zusammenfassend erklärten sie die Gültigkeit der Regel

- durch eine Übereinstimmung der theoretisch hergeleiteten Geometrie der Substratbindungsstelle (Modell zweier "Substrat-Taschen" unterschiedlicher Größe) mit dem durch Röntgenstrukturanalyse erhaltenen Strukturdaten;
- durch eine Störung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Histidin des aktiven Zentrums und dem Substrat, wenn das nicht bevorzugt reagierende Enantiomer vorliegt;
- dadurch, daß die Enantiopräferenz nicht durch eine vom katalytischen Zentrum getrennte Bindungsstelle für sekundäre Alkohole bestimmt ist, sondern durch die gleichen Teile des katalytischen Apparates. Diese ist bei nahezu allen Lipasen ähnlich aufgebaut und erklärt die Gültigkeit der Regel für viele Lipasen und Esterasen.

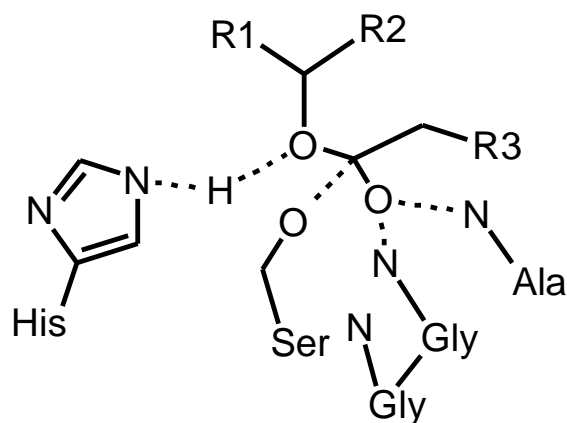


Abbildung 3.30: Bindung eines Esters im aktiven Zentrum von Lipasen (Übergangszustand: R1 & R2 gehören zu einem sekundären Alkohol, während R3 zu der freiwerdenden Carbonsäure gehört). Nach Cygler et al. ist eine hohe Stereoselektivität von Lipasen gegeben, wenn der entstehende sekundäre Alkohol unterschiedlich große Molekülreste neben der Hydroxygruppe aufweist ($R1 \gg R2$)

Die Lipase aus *Candida Rugosa* (CRL), vormals *Candida Cylindracea*, ist aufgrund ihrer Stereoselektivität eine der am besten untersuchten Hydrolasen, die weltweit in der Industrie eingesetzt werden (Benjamin 1997 & 1998). Der Mikroorganismus produziert fünf Isoenzyme (Diczfalusy 1997) mit jeweils 543 Aminosäuren (ca. 60 kDa), die zusammen als CRL sowohl in der Nahrungsmittelindustrie bei der Fettspaltung als auch bei chemischen Synthesen zur Racemattrennung eingesetzt werden.

Die *Candida Rugosa* Lipase bietet sich als Biokatalysator aufgrund der guten Stabilität und Stereoselektivität zur Synthese in nichtwässrigen Lösemitteln an. Wie Tabelle 3.9 zeigt, befassten sich viele Arbeitsgruppen in den letzten Jahren mit den unterschiedlichen Aspekten der *Candida Rugosa* Lipase in ungewöhnlichen Reaktionsmedien, die als gemeinsames Merkmal aufweisen, daß sie eine erheblich bessere Löslichkeit für hydrophobe Substrate zeigen als Wasser.

Tabelle 3.9: *Candida Rugosa* Lipase in ungewöhnlichen Reaktionsmedien

Medium	Untersuchung	Ref.
überkritisches CO ₂	Racemattrennung von Menthol	<i>Michor 1996 & 1997</i>
Vinylacetat	Stereosel. Synthese eines Insektizid-Esters	<i>Costa 1998</i>
Hexan	enantioselektive Veresterung von Menthol mit Säureanhydriden	<i>Wu 1996</i>
AOT / Isooktan	Veresterung zu verschiedenen Triglyceriden	<i>Hayes 1990</i>
AOT / Isooktan	Veresterung verschiedener Terpene	<i>Lee 1998 a</i>
Isopropylether	Temperaturabh. der Enantioselektivität bei der Veresterung von versch. Ibuprofen-analoga	<i>Yasufuku 1997</i>
überkritisches CO ₂ und 15 versch. Lösungsmittel	Veresterung von racemischen 1-Phenylcyclohexanol	<i>Celia 1999</i>
Isooktan (Zuckertensid für die Darstellung einer "Surfactant coated Lipase")	enantioselektive Veresterung von 2-Oktanol und Phenylethanol mit Laurinsäure	<i>Kamiya 1999</i>
Isooktan	Racemattrennung von Naproxenanaloga mit Racemisierung des überschüssigen Enantiomers	<i>Chang 1999 a&b</i>
Butanol (Supersaturierte Substratlösung)	Enantioselektivitätssteigerung durch Alkalimetallionenzugabe	<i>Okamoto 1999</i>
Toluol, Hexan, Diisopropylether, Trichlorethan	Untersuchung und Evaluierung der Ping-Pong Kinetik	<i>Janssen 1999</i>
Zweiphasensysteme (Substratüberschuß)	Vergleich: Umesterung, Hydrolyse, Veresterung (Darstellung von enantiomerenreinem 2-Butanol)	<i>Cambou 1984</i>

Ein wesentliches Merkmal der CRL ist die Stereoselektivität bei der Katalyse mit verschiedenen Substraten, die nicht zu den Triglyceriden gehören, auch in organischen Reaktionsmedien. Hierbei sind vor allem die Racemattrennungen von Menthol, Geraniol und den Phenylpropionsäurederivaten Naproxen sowie Ibuprofen zu erwähnen, die mit einem vollständigen Enantiomerenüberschuß möglich sind (*Chang 1998 & 1999 a, Xu 1995 a & b, Jianhe 1998, Giorno 1997 b, Kamiya 1997, Huang 1998*). Für die Veresterung und die Hydrolyse von racemischem Menthol ist der Mechanismus im aktiven Zentrum der CRL nahezu vollständig aufgeklärt (*Cygler 1994, Grochulski 1993*).

Aufgrund der sehr geringen Wasserlöslichkeit der beteiligten Stoffe, bietet sich diese Reaktion für eine Reaktionsführung in einer w/o-Mikroemulsion als Alternative zu wäßrigen Reaktionsmedien oder Mehrphasensystemen an. Als Substrat, das nicht nur Modellcharakter hat, wurde racemisches Menthol für die Lipase-katalysierte Veresterung gewählt. Als Acyldonor wurde Propionsäureanhydrid benutzt, da die Veresterung mit einer freien Carbonsäure aufgrund des freiwerdenden Wassers die Veresterung verlangsamt und möglicherweise Einfluß auf die Stabilität der Mikroemulsion nimmt. Der Bildung des Acyl-Enzym-Intermediats in organischen Reaktionsmedien wird eine geschwindigkeits-bestimmende Rolle zugeschrieben (*Garcia-Alles 1998, Xu 1995 a & b*). Daher ist bei Verwendung von Säureanhydriden die Reaktionsgeschwindigkeit höher als mit freien Carbonsäuren.

CRL-katalysierte p-Nitrophenyllaurat-Hydrolyse

Um die Reaktionsbedingungen und die Zusammensetzung der Mikroemulsion für eine Veresterungsreaktion zu optimieren, wurde die CRL zunächst mit einem Modellsubstrat, p-Nitrophenyllaurat (PNPL), in verschiedenen Mikroemulsionen untersucht. Die Autohydrolyse von PNPL kann bei der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit CRL vernachlässigt werden, da sie sowohl in Wasser (mit Triton X100) als auch in Mikroemulsionen erst nach etwa 10 Minuten meßbar einsetzt. Das Reaktionsschema der PNPL - Hydrolyse in einer w/o-Mikroemulsion ist in Abb. 3.31 gezeigt. Dabei befindet sich das hydrophile Enzym im Wasserkern der inversen Mizelle, während die Substrate und das Reaktionsprodukt Laurylsäure im Öl lokalisiert sind, was durch Ultrafiltrationsversuche des Reaktionsmediums bestätigt würde. Das Reaktionsprodukt p-Nitrophenol ist, nicht wie in der Abbildung dargestellt im Öl, sondern liegt in den inversen Mizellen oder der inneren Grenzfläche vor.

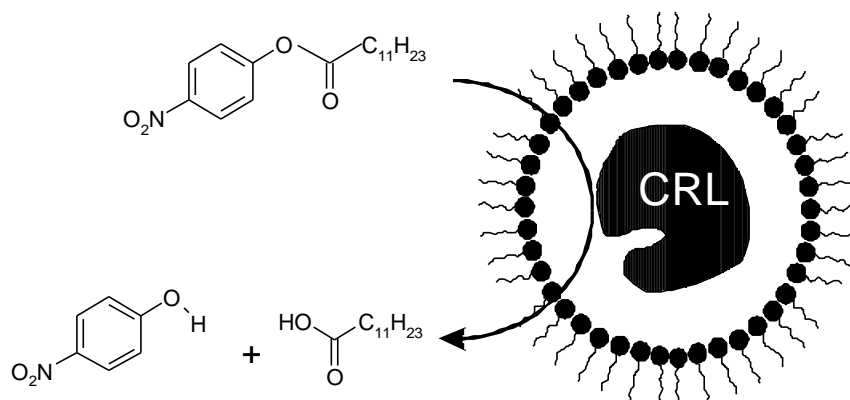


Abbildung 3.31: Reaktionsschema der CRL-katalysierten p-Nitrophenyllaurat-Hydrolyse in einer w/o-Mikroemulsion

Die Reaktionsgeschwindigkeit der PNPL-Hydrolyse in einer Mikroemulsion ist von deren Zusammensetzung abhängig. Die Tensidkonzentration in der Mikroemulsion definiert die Größe der inneren Grenzfläche, hat jedoch keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse, wenn das Verhältnis von Wasser zu Tensid, w_0 , konstant bleibt. Anders verhält es sich mit dem w_0 -Wert, welcher proportional zur Größe der inversen Mizelle. Es zeigt sich ein Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit bei sehr geringen Wasserkonzentrationen, wie in Abbildung 3.7 (Kap. 3.1.3) dargestellt. Hieraus kann man schlußfolgern, daß die Aktivität der CRL nicht nur durch die Anwesenheit einer Grenzfläche allein gesteigert wird, sondern noch weiter erhöht werden kann, wenn das Enzym in die Grenzfläche gezwungen wird. Dieses wird durch kleine inverse Mizellen (kleiner w_0 -Wert) erreicht.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Lipaseaktivität und die Stabilität bei w_1 -Werten unter eins (AOT / Isooktan / Wasser) stark abnimmt (Holmberg 1994, Ruckenstein 1992). Klivanov und Zaks haben jedoch auch Enzymaktivität bei Wassergehalten am Protein feststellen können, die aus weniger als einer Monolage aus Wassermolekülen bestand (Zaks 1988 a). Ein solch geringer Wassergehalt war jedoch aufgrund der Mischungslücke im untersuchten Mikroemulsionssystem nicht einstellbar.

Neben der optimalen Zusammensetzung der Mikroemulsion ist auch der optimale pH- und Temperaturbereich der CRL ermittelt worden. Die meisten Enzyme besitzen neben einem pH-Optimum ein Temperaturoptimum je nach Organismus. Bei zu hohen Temperaturen werden wie bei pH-Änderungen durch zu große thermische Bewegung die intramolekularen Bindungen, die die Proteinstruktur stabilisieren, zerstört. Für die pH- und Temperaturabhängigkeit der CRL in einer Mikroemulsion ergeben sich die in Abb. 3.32 gezeigten Zusammenhänge:

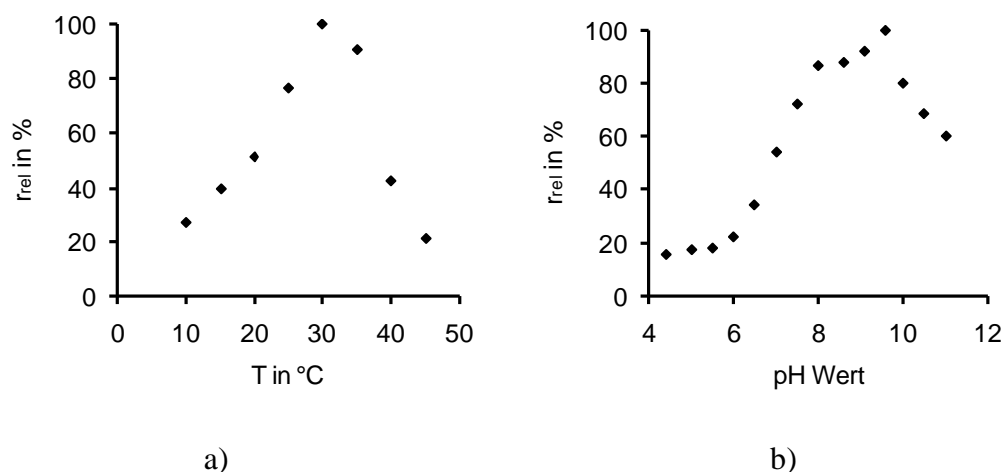


Abbildung 3.32: a) Relative Aktivität von CRL (bezogen auf die höchste gemessene Aktivität) in Abhängigkeit vom pH-Wert ($T=25^{\circ}\text{C}$). b) Relative Aktivität von CRL (bezogen auf die höchste gemessene Aktivität) in Abhängigkeit von der Temperatur (links, $\text{pH}=8$) in einer Mikroemulsion aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,15$ und $w_1 = 5$.

Die Temperatur- und die pH - Abhängigkeit der CRL ist in der Mikroemulsion die gleiche wie in Wasser. Es zeigt sich eine starke Abweichung der UV/VIS-Adsorption von p-Nitrophenol in wäßrigen Reaktionsmedien und in einer Mikroemulsion. Daß sich unterschiedliche pK_a - Werte in reinem Wasser und w/o-Mikroemulsionen oder Mehrphasensystemen ergeben, wurde bereits früher für pH - Farbindikatoren (Seoud 1989) und speziell für Aminosäuren gezeigt (Zhou 1997). Für das untersuchte System mit p-Nitrophenol ergeben sich die in Abb. 3.33 gezeigten Zusammenhänge:

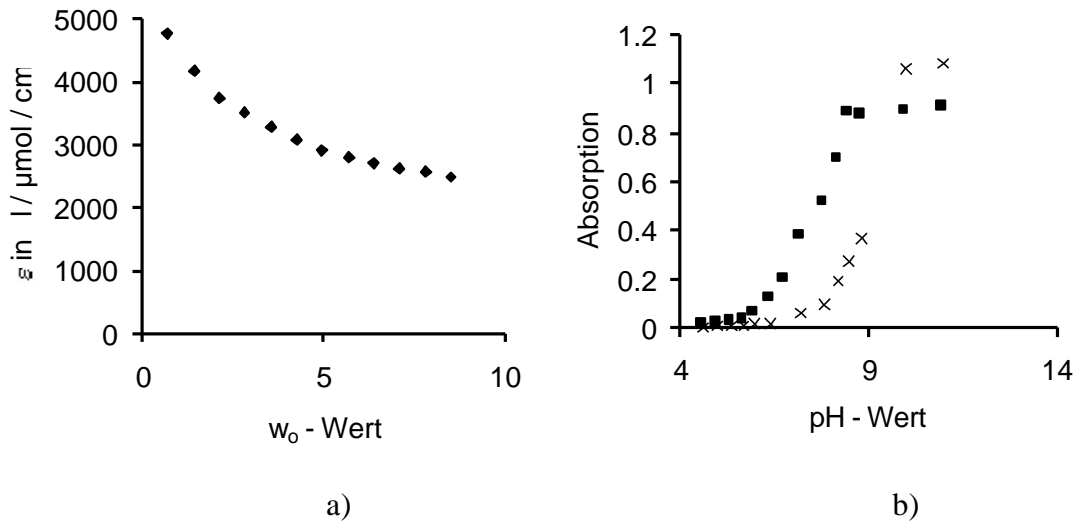


Abbildung 3.33: a) Extinktionskoeffizient von PNP bei verschiedenen Wassergehalten in einer Mikroemulsion (Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,15$). b) Detektion des Umschlagpunktes von PNP in Wasser (λ , 393 nm) und einer Mikroemulsion (X, 399 nm) aus Igepal CA520 + Triton X100 (9+1) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,15$ und $w_o = 10$.

Die Erklärung für die Unterschiede ist einerseits in der unterschiedlichen Verteilung der Moleküle in den Mikrokompartimenten der Mikroemulsion zu sehen (Ölphase, Wasserphase, Grenzfläche - jeweils mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften), andererseits auch durch Verschiebungen der Säure-Base-Gleichgewichte durch die unterschiedlichen elektrostatischen Kräfte an der inneren Grenzfläche (*Perutz 1978*). Das Aktivitätsmaximum von Enzymen kann daher in Wasser und w/o-Mikroemulsionen durchaus bei unterschiedlichen pH-Werten liegen. Bei den verwendeten Enzymen, wie der CRL, wurde dieses jedoch nicht festgestellt.

Für die optimierte Mikroemulsionszusammensetzung mit $\gamma = 0,15$ und $w_1 = 5$ bei pH 8 wurde, wie in Abb. 3.34 dargestellt, die Kinetik der PNPL Hydrolyse untersucht:

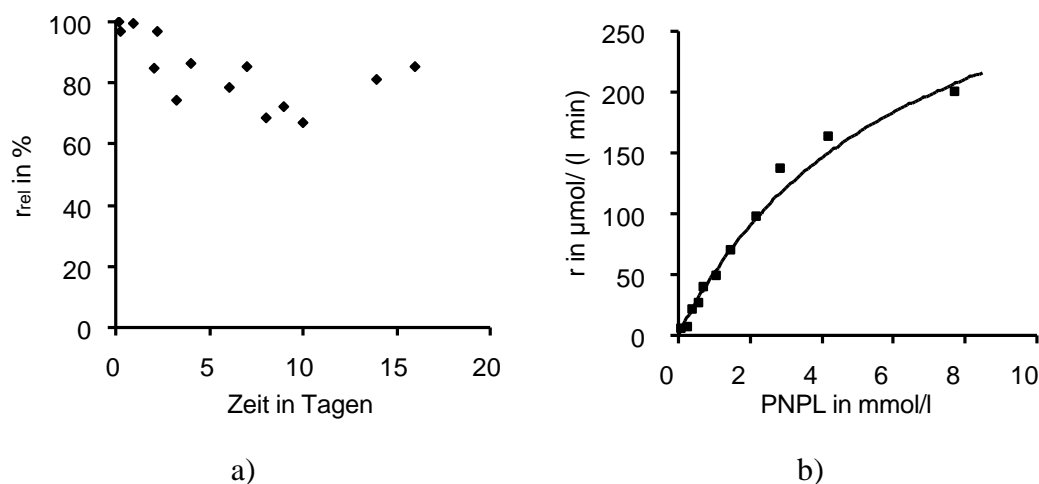


Abbildung 3.34: a) Desaktivierung von CRL bezogen auf gemessene Aktivität bei $t = 0$. b) Konzentrationsabhängigkeit der PNPL – Hydrolyse bei 25°C und $\text{pH} = 8$ in einer Mikroemulsion aus Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $\gamma = 0,15$ und $w_1 = 5$.

Da PNPL selbst in einer wässrigen 5% igen Triton X100 – Lösung maximal zu einem Millimol löslich ist, können die kinetischen Daten nur qualitativ mit denen im wässrigen Reaktionsmedium verglichen werden. Hier zeigte sich bei Vorversuchen im Anfangsbereich der Konzentrationen (bis 1 mM) kein Unterschied zu den gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten in der Mikroemulsion.

Die Anpassung der Meßdaten an die Michaelis-Menten-Kinetik und einem Ein-Schritt-Desaktivierungsmechanismus bei 25°C und $\text{pH} = 8$ ergab folgende Werte:

$$r_{\max} = 251 \text{ U/mg}$$

$$K_{M,\text{PNPL}} = 6,35 \text{ mmol/l}$$

$$k_D = 0,0187 \text{ d}^{-1}$$

Besonders die hohe Stabilität der CRL (mit einer Halbwertszeit von 37 Tagen bei einer Temperatur von 25°C) in der verwendeten Mikroemulsion ist hier hervorzuheben. Bei einer höheren Temperatur sinkt diese jedoch merklich ab (z.B. $k_D = 1,05 \text{ d}^{-1}$ bei 30°C ; $k_D = 2,5 \text{ d}^{-1}$ bei 35°C ; $k_D = 8,3 \text{ d}^{-1}$ bei 45°C).

CRL – katalysierte Veresterung von Menthol

w/o-Mikroemulsionen bieten sich für die enantioselektive Veresterung von Menthol an, da dieses wasserunlöslich ist und in der Mikroemulsion mit dem wasserlöslichen Enzym in

Kontakt gebracht werden kann. Es ergibt sich für die Veresterung mit Propionsäureanhydrid folgendes Reaktionsschema:

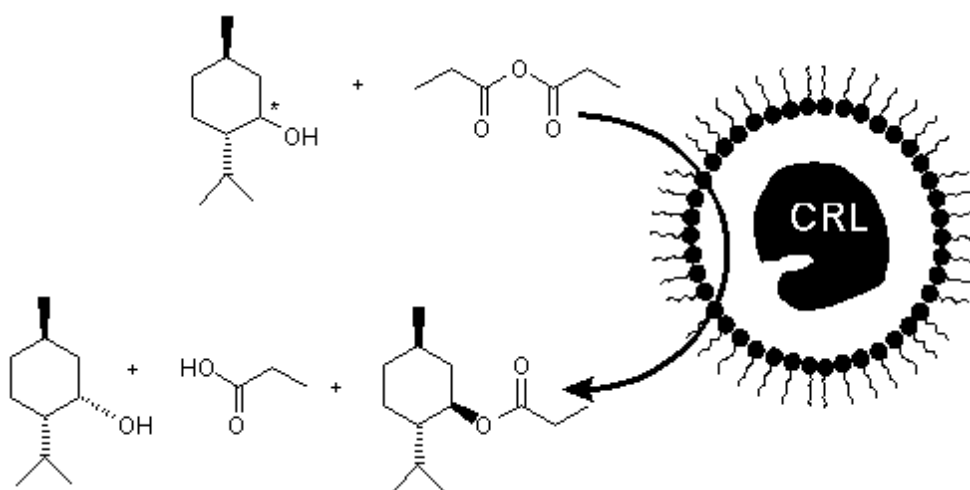


Abbildung 3.35: Reaktionsschema der enantioselektiven Veresterung von Menthol in einer w/o-Mikroemulsion

Die wesentliche Rolle der CRL in dieser Reaktion ist die enantioselective Veresterung des (-)-Menthols. Von verschiedenen Autoren wird über Enantiomerenüberschüsse von 50-70 % in organischen Reaktionsmedien berichtet (*Wu 1996, Kamiya 1997 & 1999*). Die CRL-katalysierte Reaktion ist jedoch mit ee-Werten von 100 % realisierbar, wenn die unspezifische Reaktion von Propionsäureanhydrid mit dem Menthol unterdrückt werden kann. Wie in der folgenden Abbildung gezeigt ist, reagieren Propionsäureanhydrid und Menthol in hohen Konzentrationen innerhalb weniger Stunden mit, in Bezug auf die Lipase-katalysierte enantioselective Reaktion, nicht zu vernachlässigen Umsätzen:

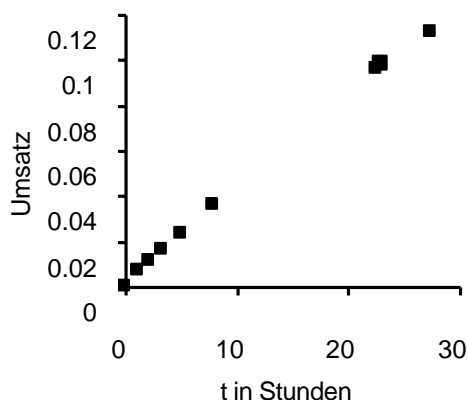


Abbildung 3.36: Veresterung von rac. Menthol (100 mM) mit Propionsäureanhydrid (100 mM) in Cyclohexan bei 25°C.

Die kinetischen Daten der CRL-katalysierten Veresterung wurden durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (Umsatz bei 30min, ee-Werte immer 100 %) bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (siehe auch Kap.7) annähernd ermittelt. So konnte die Michaelis-Menten-Konstante des (-)-Menthols bei $K_{M, \text{Menthol}} = 17 \text{ mM}$ bestimmt werden (rac. Menthol bei $K_{M, \pm \text{Menthol}} = 34 \text{ mM}$). Die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante für das Propionsäureanhydrid gestaltete sich wesentlich schwieriger, da mit zunehmender Konzentration die Stabilität der CRL abnahm. Es wurde ein Wert von $K_{M, \text{Propionsäureanhydrid}} = 15 \text{ mM}$ ermittelt, der mit einem relativ großem Fehler behaftet ist. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit $r_{\max} = 0,043 \text{ U /mg}$ bestimmt.

Ausgehend von den kinetischen Daten der Veresterung wurde ein Feed-Batch-Prozeß konzipiert, bei dem die Anhydridkonzentration möglichst gering gehalten wurde, um einerseits eine hohe Stabilität der CRL zu gewährleisten und andererseits die unspezifische (nicht katalysierte) Reaktion der Reaktanden zu verhindern. In Abb. 3.37 ist die Reaktion bis zu einem Umsatz von 25 % dargestellt:

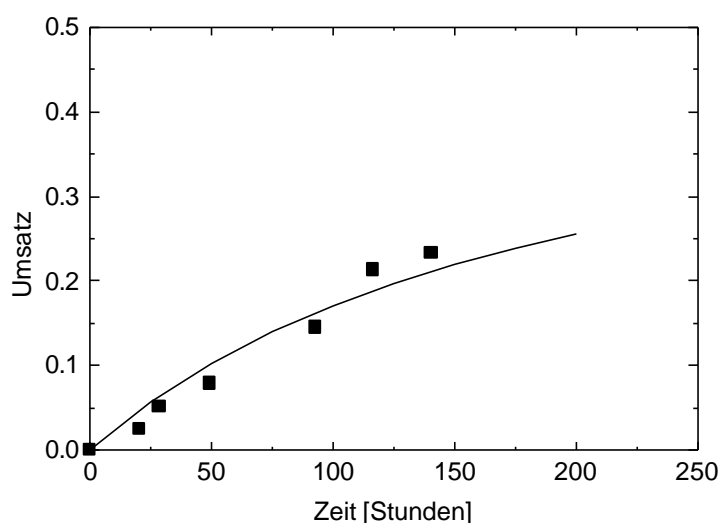


Abbildung 3.37: Umsatz der CRL – katalysierten (0,078 mg/ml) Veresterung von rac. Menthol (100mM) mit Propionsäureanhydrid in einer Mikroemulsion (Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($w_0 = 5$ $\gamma = 0,12$) bei 25°C und pH 8 (25 mM Puffer). Das reagierte Propionsäureanhydrid wurde alle 20 h nachtitriert (Start mit 10mM).

Die ee-Werte dieser Reaktion im Feed-batch-Versuch lagen bis 100 h bei $ee = 100 \%$. Anschließend wurde auch das andere Enantiomer des Mentholesters detektiert, die ee-Werte lagen jedoch weiterhin über 99,5 %.

3.3 Die Ultrafiltration tensidhaltiger Reaktionslösungen^{*}

Werden Enzyme in Mikroemulsionen verwendet, so müssen diese aus Kostengründen immobilisiert oder zurückgewonnen werden. Eine gängige Methode zur Aufspaltung einer Mikroemulsion ist eine Temperaturänderung, wodurch ein Zweiphasengebiet im Phasendiagramm erreicht wird. Während der Ölanteil die hydrophoben Substrate und Produkte enthält, kann der enzymhaltige, wäßrige Anteil separiert und wiederverwendet werden (Larsson 1990). Diese Methode erlaubt eine mehrfache Verwendung des Biokatalysators bei Reaktionsführung im Batch-Modus, allerdings auf Kosten der Stabilität. Daneben wird von anderen Autoren zur Separierung des Enzyms eine Ultrazentrifuge vorgeschlagen, die die enzymhaltigen, inversen Mizellen von der übrigen Reaktionslösung separieren kann und auch für eine kontinuierliche Reaktionsführung geeignet ist (Russel 1994). Eine weitere sinnvolle Alternative stellt eine Ultrafiltration des Reaktionsmediums in Analogie zu gängigen Enzym-Membran-Reaktorsystemen (Kragl 1990) dar. Dieser Weg der Rückgewinnung des Enzyms wird in dieser Arbeit ausführlicher untersucht.

Um die Betriebsbedingungen für die UF von tensidhaltigen Lösungen zu untersuchen, muß zunächst unterschieden werden, ob es sich um Lösungen oberhalb oder unterhalb der cmc bzw. c_{mc} handelt, da diese Konzentration auf den Filtrationsverlauf entscheidenden Einfluß hat. Darüberhinaus spielt die Art des Lösemittels sowie die Wechselwirkungen des Tensides mit dem Membranmaterial eine wesentliche Rolle für den sich einstellenden Transmembrandruck. Für die Ultrafiltration auch tensidhaltiger Lösungen mit Wasser als Lösemittel werden von verschiedenen Herstellern unterschiedlichste neue Membranmaterialien, neben den bereits etablierten Membranen aus modifizierter Cellulose, bereitgestellt, wie in folgender Tabelle 3.10 dargestellt.

^{*} Teile dieses Kapitels sind veröffentlicht in: B. Orlich, R. Schomäcker; Die Ultrafiltration von w/o-Mikroemulsionen in der Biokatalyse; *Chem. Ing. Tech.*; 1999, 71(1&2), S. 156-159; B. Orlich, R. Schomäcker; *Chem. Eng. Technol.*; 1999, 22(9), S. 753-757
B. Orlich, R. Schomäcker. Candida Rugosa lipase reactions in nonionic w/o-microemulsion with a technical surfactant. Akzeptiert für *Enz. Microbial. Technol.* (in press)

Tabelle 3.10: Auszug von Herstellern kommerzieller Ultrafiltrationsmembranen

Firma	neue Membranmaterialien
Amicon & Millipore	PSU, PA, PVDF
Torey / Tri Sep	modifiziertes Celluloseacetat
Machere& Nagel	PVDF, Polycarbonat
Koch	PVDF
Berghof	PES, PA
Osmonics	PTFE, PES, PVDF
Hoechst / Celgard	PA
Pall-Gelman	PTFE, PVDF

PES = Poly ether sulfon

PA = Polyamid

PSU = Polysulfon

PVDF = Poly(vinylidene fluoride)

Nur wenige Materialien eignen sich jedoch, wie in dieser Arbeit untersucht, für die Filtration von Mikroemulsionen, da die Membranen zuvor auf die Alkane konditioniert werden müssen (wie in Kap. 7 beschrieben). PES und PA bieten sich hierfür an, da das Material durch die Konditionierung nicht zerstört wird, sondern aufgrund der Wechselwirkungen mit den Lösemitteln nur leicht aufquillt, wie die folgende Abbildung 3.38 zeigt:

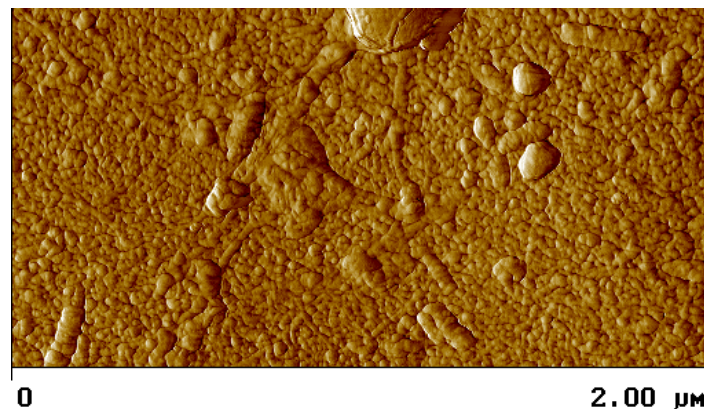


Abbildung 3.38: AFM einer auf Cyclohexan konditionierten BM100 UF – Membranoberfläche

Die Membranen kommen in zwei Ausführungen zum Einsatz:

- **Flachmembranen:** Die Flachmembran ist im Labor die am häufigsten anzutreffende Form der Membranen, da sie problemlos zu handhaben und preisgünstig in großer Vielfalt kommerziell erhältlich ist. In industriellen Anwendungen werden Flachmembranen mittels Abstandhalter zu Wickel-, Platten- oder auch Spiralwickelmodulen gepackt.

- **Kapillarmembranen:** Diese Membranart ist die in der Industrie häufig genutzte Form, da sie eine hohe Packungsdichte, d.h. eine hohe Membranfläche pro Volumen, garantiert (bis zu 5000 m²/m³). Die Hohlfasermembranen (mit Innendurchmessern zwischen 100 µm bis 20 mm) werden an den Enden verklebt und damit wird die Faserseite (Feed und Retentat) von der Mantelseite (Permeat) getrennt.

Fermentationslösungen werden oft Tenside oberhalb des Trübungspunktes als Antischaummittel zugesetzt. Wesentlich für die Filtration tensidhaltiger Lösungen ist die Fluxreduktion, die durch die Adsorption des speziellen Tensids hervorgerufen wird (*Chong 1985, Yamagiwa 1993*). Gegenüber der Adsorption des Tensides kann die Konzentrationspolarisation oft vernachlässigt werden.

Während sich bei der Verwendung ionischer Tenside in vielen Fällen die Porenverkleinerung von UF-Membranen nach Jönsson & Jönsson beschreiben lässt (*Jönsson 1991*), ist diese bei der Verwendung nichtionischer Tenside nur selten der Fall. Bei ionischen Tensiden wird die Pore mit einer monomolekularen Tensidschicht verkleinert. Sie arrangieren sich je nach Packungsparameter und Konzentration des Tensides in der Pore und können diese im Falle kleiner Poren auch vollständig verstopfen.

Die Adsorption von Tensiden an festen Oberflächen kann durch die Theorie von Langmuir beschrieben werden. Der Bedeckungsgrad des Festkörpers wird wie folgt beschrieben:

$$\Theta = \frac{c \cdot b}{1 + c \cdot b} \quad (18)$$

mit

- c: Konzentration der Lösung,
- b: temperaturabhängiger Adsorptionskoeffizient und
- Θ: Bedeckungsgrad des Festkörpers

Die Temperaturabhängigkeit des Adsorptionskoeffizienten wird wie folgt beschrieben:

$$b = b_{\infty} \cdot e^{\frac{Q}{RT}} \quad (19)$$

mit

- Q: Adsorptionswärme,
- R: Gaskonstante und

T: Temperatur.

Bei der Adsorption von nichtionischen Tensiden an Festkörpern wurde jedoch im Gegensatz zu ionischen Tensiden eine Besonderheit von Király und Findenegg festgestellt (*Király 1997 & 1998* - erste Ansätze bei *Jönsson 1991*): Während ionische Tenside sich proportional zur Konzentration an der Oberfläche anlagern, bis eine monomolekulare Schicht an ihr vorliegt (Bedeckungsgrad = 1), ist bei nichtionischen Tensiden zunächst die Adsorption vereinzelter "Ankermoleküle" zu beobachten. Der Bedeckungsgrad von Ankermolekülen am Festkörper bleibt sehr gering. Ab einer bestimmten Konzentration, der "Critical Surface Aggregation Concentration" (csac) lagern sich keine weiteren Ankermoleküle an der Oberfläche an. Stattdessen findet die weitere Adsorption am Festkörper an den Ankermolekülen selbst statt, wobei sich im weiteren Verlauf Aggregate aus den Ankermolekülen bilden. Der Bedeckungsgrad der Oberfläche ändert sich nun nicht mehr und die Aggregate rund um die Ankermoleküle wachsen mit steigender Konzentration an, bis die cmc erreicht ist. Ab der cmc findet keine weitere Adsorption von nichtionischen Tensiden an der Oberfläche statt, da die Mizellbildung gegenüber der weiteren Adsorption an den oberflächengebundenen Aggregaten thermodynamisch bevorzugt ist. Die Messungen von Király wurden mit porösen, hydrophilen Gläsern durchgeführt. Bei der Untersuchung von Membranen ergaben sich die gleichen Zusammenhänge zwischen der Adsorption des Tensides und Konzentration in der Lösung, welche jedoch keine quantifizierbaren Werte z.B. für die csac ergaben.

3.3.1 Der Volumenfluß und Rückhalt bei der UF wäßriger Tensidlösungen

Die Filtration wäßriger Tensidlösungen ist aufgrund der Anwendungsbreite ein stark erforschtes Gebiet der Membrantechnik. Das Hauptaugenmerk richtet sich auf die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen ionischen und nichtionischen Tensiden und den unterschiedlichen Membranmaterialien. So können bei Verwendung verschiedener Materialien unterschiedliche Adsorptionen und somit Foulingprobleme bei der Verwendung ein und desselben Tensides auftauchen, wie es in folgenden Abbildungen gezeigt ist:

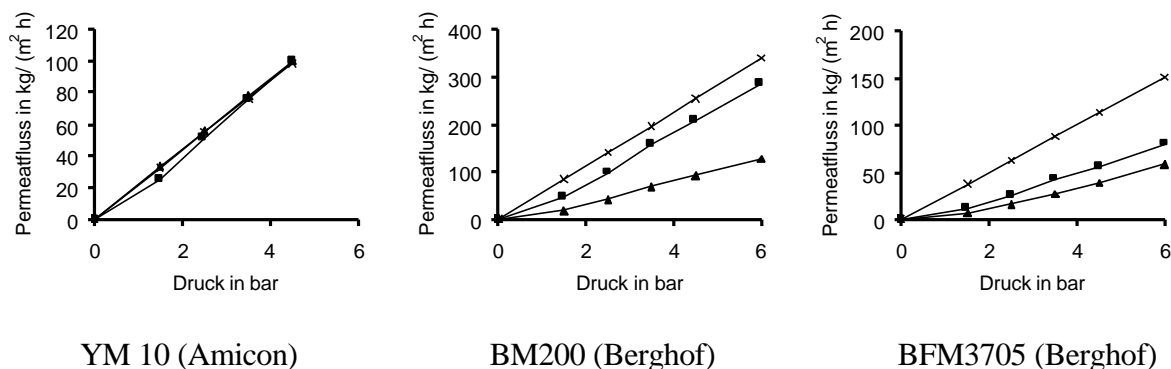


Abbildung 3.39: Permeatfluß bei der Filtration wäßriger Tensidlösungen mit Konzentrationen unterhalb der cmc (X = reines Wasser; I = 0,005 % Marlipal O13-200; ? = 0,005 % Marlipal O13-40) durch verschiedene Membranen bei 25°C.

Verschiedene nichtionische Tenside können bei demselben Membranmaterial unterschiedliche Adsorptionen zeigen, wie in Abbildung 3.39 zu erkennen ist. So wird das hydrophobe Marlipal O13-40 an der Polyamidmembran (BM 200) und der Polyethersulfonmembran (BFM 3705) sehr viel stärker als Marlipal O13-200 adsorbiert, was zu einer signifikanten Reduktion des Volumenflusses führt. Im Falle der YM10 Membran tritt kaum Adsorption der Tenside auf. Die Membran ist mit Flüssen unterhalb 40 kg/(m² h bar) eine im Vergleich zu anderen Membranen dichte Membran, bei der ein Fouling durch Tenside zum Verschluß führen würde. Daher ist die Oberfläche der Membran (Material: aromatisches Polyamid) vermutlich durch einen PTFE – Überzug inertisiert worden.

Für die Lösung eines Trennproblems muß für ein gegebenes Tensidsystem zunächst eine geeignete Membran gefunden werden (bzw. bei vorgegebener Membran ein geeignetes Tensid), um eine optimierte Filtration mit hohen Flußraten zu entwickeln.

3.3.2 Der Volumenfluß und Rückhalt bei der UF von Mikroemulsionen

Bei der Ultrafiltration einer Lösung mit inversen Mizellen steigt der Fluß zunächst linear mit dem Druck an. Aufgrund der Anreicherung der inversen Mizellen an der Membranoberfläche bei größeren Permeatflüssen, nimmt die Steigung des Flusses als Funktion des Druckes bei mittleren Drücken ab und geht bei hohen Drücken in einen konstanten Wert über, welcher als Grenzfluß J_V^∞ bezeichnet wird. Wird die Konzentration der zurückzuhaltenden Substanz erhöht, sinkt der Wert des Grenzflusses, während er bei einer Erniedrigung steigt. Wie in Abbildung 3.40 gezeigt, liegen die Volumenflüsse bei der Filtration der Mikroemulsionen mit dem Tensid

Marlipal O13-60 (abgetoppt) unter $10 \text{ kg/m}^2 \text{ h}$ und es stellt sich bereits bei 2 – 3 bar ein Grenzfluß ein.

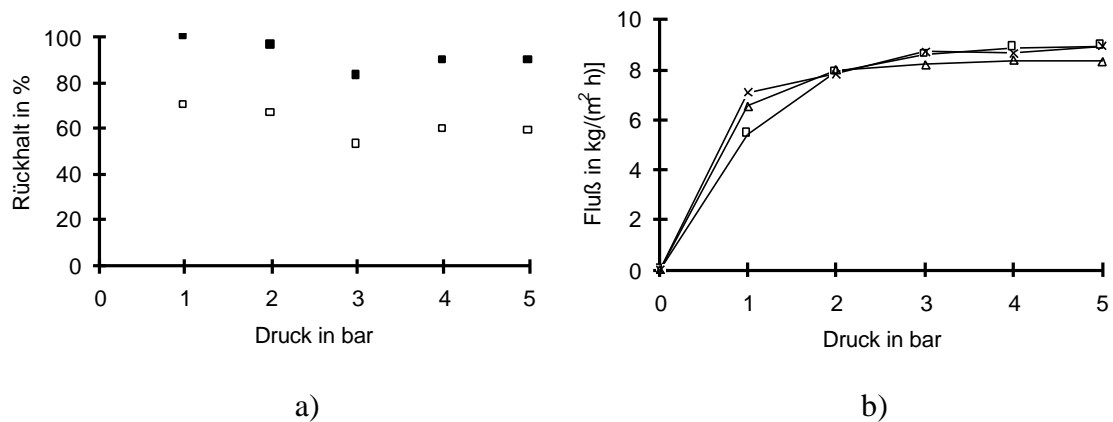


Abbildung 3.40: a) Rückhalt von abgetopptem Marlipal O13-60 in einer Mikroemulsion ($\gamma = 0,1$ und $w_0 = 10$). Dargestellt ist zum einen der Tensidrückhalt (offene Symbole) und der mizellare Rückhalt (geschlossene Symbole). b) Der Volumenfluß bei der Filtration von Mikroemulsionen ($\gamma = 0,1$ und $w_0 = 10$) mit verschiedenen Tensiden der Marlipal-Reihe (X: O13-60, ?: abgetopptes O13-60, ? : O13-80) ist nahezu gleich.

Der Grund hierfür liegt in der starken Adsorption des Tensides an der Membran, wodurch die Porengröße drastisch reduziert wird. Aufgrund dieser Porenverkleinerung bleiben die in Abbildung 3.40 dargestellten Rückhalte, welche nahezu linear mit dem Druck absinken, im Vergleich zur Filtration anderer ionischer und nichtionischer Mikroemulsionen relativ hoch (Schomäcker 1996). Das Fouling an der Membran, ein für einen kontinuierlichen Prozeß wichtiges Merkmal bei der Ultrafiltration, machte sich erst nach viele Betriebsstunden ($>25 \text{ h}$) bemerkbar.

3.3.3 Modellbeschreibung der Ultrafiltration von Mikroemulsionen*

Die physikalischen Vorgänge an der Membran während der Filtration, d.h. die Beschreibung der Konzentrationspolarisation, kann analog zur Filtration von Makromolekülen erfolgen. Für die Filtration von Makromolekülen bieten sich verschiedene Modelle an, wie das Gelschichtmodell, das Modell des osmotischen Druckes (Wijmans 1984, Mulder 1990), das Modell der seriellen Widerstände oder das Modell der Reibungskraft, die auch auf die Filtration von w/o-Mikroemulsionen angewendet werden können.

* Teile dieses Kapitels wurden veröffentlicht in: R. Schomäcker, B. Orlich, G. Braun; Ultrafiltration of Reverse Micelles in the Ternary System Igepal CA 520/Cyclohexane/Water; *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*; 1997, 101 (11), S. 1695-1699

Wesentlicher Schwachpunkt der ersten drei genannten Modelle ist, daß sie von einer Gelschicht mit konstanter Konzentration an der Membranoberfläche ausgehen, welcher dem Permeatstrom als Widerstand entgegensteht. Diese Modelle reichen zur Beschreibung des Permeatstromes aus, sind aus physikalischen Überlegungen heraus jedoch falsch, da die Konzentration der Gelschicht zur Bulk-Lösung hin kontinuierlich abnehmen muß. Desweiteren wird bei diesen Modellen von einem Rückhalt von 100 % ausgegangen. Das Model der Reibungskraft (*Jönsson 1996*) versucht diesen Fehler dahingehend zu beheben, indem es der thermodynamischen Kraft in Richtung der Bulk-Lösung (dargestellt durch den osmotischen Druck) die Reibungskraft des Permeatstromes entgegenstellt. Bei Gleichgewichtsbedingungen müssen diese beiden Kräfte entgegengesetzt gerichtet und gleich groß sein.

Gelschichtmodell

Das Gelschichtmodell erklärt die experimentell gefundenen Zusammenhänge zwischen Konzentration, Volumenfluß und Druck wie folgt: Bei einer geringen Druckdifferenz ist der Volumenfluß klein, dadurch kann die Konzentrationsdifferenz zwischen dem Inneren der Lösung und der Membranoberfläche über die Diffusion des gelösten Stoffes ausgeglichen werden. Es ist der Bereich des linearen Zusammenhanges zwischen dem Druck und dem Volumenfluß. Bei einem Anwachsen des Druckes über diesen Bereich hinaus, kommt es zu einem schwächeren Anwachsen des Volumenflusses. Die Konzentration des gelösten Stoffes ist dann an der Membranoberfläche sehr viel höher, als im Inneren der Lösung.

Wenn die Diffusion des Stoffes zurück in das Innere der Lösung im Gegensatz zum Volumenstrom sehr klein ist, kommt es zu einer drastischen Änderung der Viskosität in diesem Bereich und es bildet sich eine Gelschicht aus. Wird die Druckdifferenz noch weiter erhöht, wächst auch die Gelschicht, welche einen hydrodynamischen Widerstand darstellt, die einem weiteren Anstieg des Volumenflusses entgegenwirkt, bis die Gelschicht schließlich nach weiterem Ansteigen des Druckes so dick geworden ist, daß sich ein Grenzfluß einstellt. Mathematisch kann der Bereich des Grenzflusses wie folgt behandelt werden:

Wenn der Rückhalt 100 % ist und somit $c_{\text{Permeat}} = 0$ ist, wird aus

$$c_{\text{Membran}} = c_{\text{feed}} \cdot e^{\frac{J_v}{k}} \quad (20)$$

im Bereich des Grenzflusses wenn $c_{\text{Membran}} = c_{\text{Gel}}$

$$J_v^\infty = k \cdot \ln \frac{c_{\text{Gel}}}{c_{\text{feed}}} \quad (21)$$

Da der Massentransferkoeffizient k und die Gelkonzentration c_{Gel} unabhängig von der Konzentration der Lösung c_{feed} sind, kann man durch die Auftragung des Grenzflusses gegen den natürlichen Logarithmus der Konzentration, aus der Steigung den Massentransferkoeffizienten und aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse die Gelkonzentration bestimmen, wie es in folgender Abbildung 3.41 gezeigt ist:

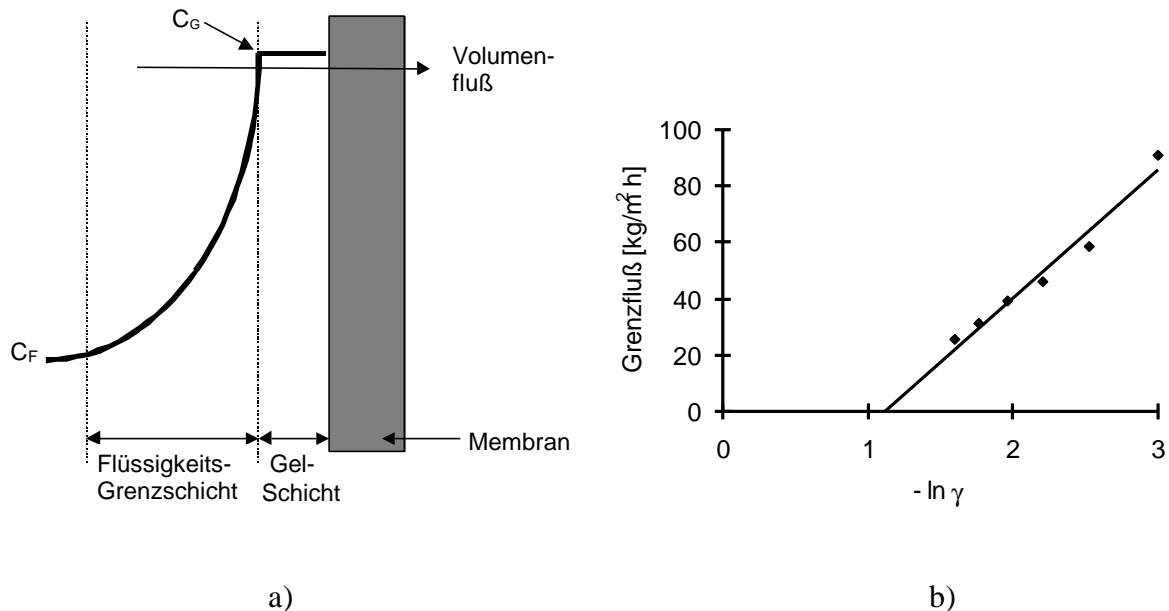


Abbildung 3.41: a) Schematische Darstellung des Konzentrationsprofils an einer Membran b) Auswertung des Grenzflusses bei der Filtration von Mikroemulsionen aus Igepal CA520 / Cyclohexan / Wasser mit $w_0 = 10$. Es ergibt sich eine Gelkonzentration von $\gamma_{\text{Gel}} = 0,41$ und ein Massentransferkoeffizient von $k = 36 \text{ kg}/(\text{m}^2 \text{ h})$

Das Modell des osmotischen Druckes

Aufgrund des durch die Filtration entstehenden Konzentrationsgradienten wird an der Membranoberfläche ein starker, osmotischer Druck $\Delta\Pi$ erzeugt, der dem angelegten Transmembrandruck ΔP entgegensteht. Der Permeatfluß wird im Modell des osmotischen Druckes daher wie folgt beschrieben:

$$J_V = \frac{\Delta P - \Delta\Pi}{R_M \cdot \eta} \quad (22)$$

Ist der Membranwiderstandswert R_M und die Viskosität η bekannt, kann der entstehende osmotische Druck durch die Messung des Permeatflusses bei gegebenem Transmembrandruck ermittelt werden. Hier zeigen sich auch die Schwächen des Modells, da bereits bei geringen Transmembrandrücken, bei denen die Konzentrationspolarisation beginnt, sehr hohe osmotische Drücke zum Bulk der Lösung hin entstehen müßten. Beim Erreichen des Grenzflusses können

daher teilweise osmotische Drücke über 7 bar berechnet werden (*Schomäcker 1997*), was sicherlich unrealistisch ist.

Das Modell des Kräftegleichgewichts

Das Modell des Kräftegleichgewichts geht von einer Gleichgewichtslage zwischen dem osmotischen Druck (ins Innere der Lösung gerichtet) und der Reibungskraft des Lösemittels an den inversen Mizellen aus, wie es in Abb. 3.42 schematisch dargestellt ist:

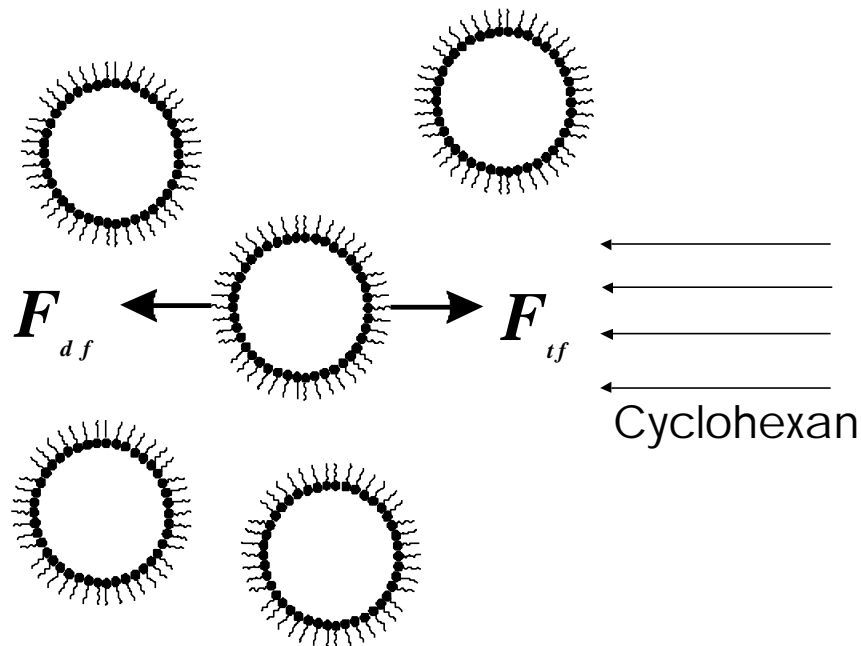


Abbildung 3.42: Reverse Mizellen während des Filtrationsvorganges; Es wirken zwei verschiedene Kräfte während der Filtration: Reibungskraft F_{df} (dragforce) und thermodynamische Kraft F_{tf} (thermodynamic force).

Während einer Filtration muss daher gelten:

$$F_{df} = F_{tf} \quad (23)$$

Die Reibungskraft lässt sich einfach über eine lineare Beziehung beschreiben:

$$F_{df} = v_{rel} \cdot f \quad (24)$$

Hierbei ist v_{rel} die relative Geschwindigkeit des Permeatstroms zur inversen Mizelle und f ein Reibungskoeffizient, welcher sich durch Sedimentationsdaten abschätzen lässt. Da für viele kolloidale Lösungen und Mikroemulsionen keine Sedimentationsdaten gewonnen werden können, kann der Koeffizient durch ein Ein-Zellen-Modell, wie in Gl. (25), theoretisch durch die Lösung der Navier-Stoke-Gleichung hergeleitet werden (*Happel 1958*):

$$f = 6phr \cdot \frac{6 + 4f^{1.67}}{6 - 9f^{0.33} + 9f^{1.67} - 6f^2} \quad (25)$$

Hierbei ist r der Radius der inversen Mizellen und ϕ deren Volumenanteil in der Lösung. Die thermodynamische Kraft ist der negative Gradient des chemischen Potentials, ausgedrückt durch die Änderung des osmotischen Druckes mit dem Abstand zur Membran. Die Konzentration der zurückzuhaltenden Substanz im Permeat und somit der Rückhalt, wird bei der Berechnung des osmotischen Druckes mit berücksichtigt:

$$F_{tf} = -V_{Agg} \cdot \frac{1-f}{f} \cdot \frac{d\Delta\Pi}{dx} \quad (26)$$

Setzt man diese beiden Kräfte nun gleich und berechnet für einen gewissen Abstand von der Membran die Konzentration der inversen Mizellen (ausgedrückt durch den Tensidmassenbruch γ), ergibt sich entgegen den gängigen Filterkuchenmodellen (siehe hierzu auch Abb. 3.41 a) das in Abb. 3.43 gezeigte Konzentrationsprofil:

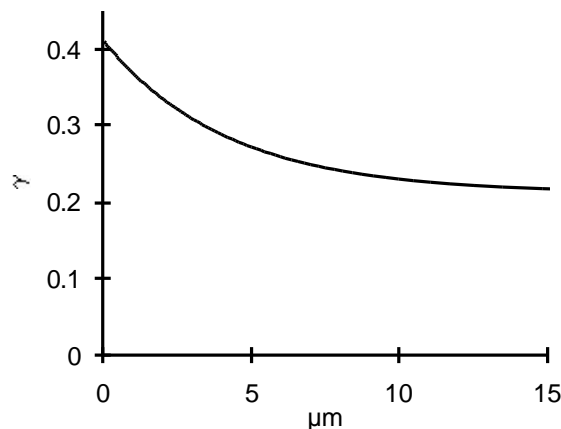


Abbildung 3.43: Berechnetes Konzentrationsprofil des Tensides im Abstand zur Membran bei der Filtration einer Mikroemulsion aus Igepal CA520 / Cyclohexan / Wasser mit $w_0 = 10$ und $\gamma = 0,2$ bei 25°C und 8 bar.

Weitergehende Beschreibungen der Ultrafiltration, die die Dynamik und die Wechselwirkungen zwischen kolloidalen Teilchen miteinbeziehen, werden von Bowen et al. beschrieben, gelten jedoch nur für harte Makromoleküle, speziell BSA mit einem Radius von ca. 3 nm (Bowen 1996 a & b).

3.3.4 Der Rückhalt bei der UF von Reaktionskomponenten in Mikroemulsionen

Die Ultrafiltration von w/o-Mikroemulsion wurde in Analogie zur Filtration wäßriger Reaktionsmedien untersucht. Da neue Entwicklungen von Membranwerkstoffen diese Applikation mit zufriedenstellenden Ergebnissen in Bezug auf Rückhalt, Volumenfluß und Stabilität ermöglichen, wurde der Volumenfluß und Rückhalt von konditionierten UF-Membranen bei der Filtration verschiedener w/o-Mikroemulsionen untersucht.

Die Eignung der Ultrafiltration für die Kopplung an kontinuierlich arbeitende Bioreaktoren mit Mikroemulsionen als Reaktionsmedien ist Gegenstand vieler Veröffentlichungen (*Lüthi 1984, Prazeres 1994, Nakamura 1995, Hakado 1996 a & b, Schomäcker 1996 & 1997, Orlich 1999 a*). Da die Verfügbarkeit von lösemittelstabilen Ultrafiltrationsmembranen sehr gering ist, werden in den veröffentlichten Arbeiten häufig Keramikmembranen verwendet, welche große Adsorptionen des Tensides und einen sehr geringen Rückhalt, in Bezug auf die inversen Mizellen, aufweisen. Auch werden mögliche Verbesserungen des Rückhaltes durch die Verwendung von Elektroultrafiltrationsmodulen vorgeschlagen, bei denen der Konzentrationspolarisation durch die inversen Mizellen mit einem starken, asymmetrischen, elektrischen Feld (1 kV/cm) entgegengewirkt wird (*Hakado 1996 a & b*), jedoch sind die Rückhalte für einen wirtschaftlichen Prozeß noch zu gering. Neu entwickelte aromatische Polyamid- und Polyethersulfonmembranen werden den Anforderungen an den Rückhalt der inversen Mizellen dagegen voll gerecht.

Bei einer kontinuierlichen Prozeßführung wird die Ultrafiltration in einer Schleife des Reaktors betrieben. Die inversen Mizellen mit den darin enthaltenen Enzymen können dem Reaktionsgemisch wieder zugeführt werden, während das Öl mit dem darin befindlichen Produkt kontinuierlich abfiltriert werden kann. Da in der w/o-Mikroemulsion eine spezifische Konzentration des Tensides, die kritische Konzentration für die Bildung inverser Mizellen c_{uc} , als Monomer vorliegt, wird diese von der Ultrafiltrationsmembran nicht zurückgehalten und befindet sich im Permeat. Neues in Öl gelöstes Edukt und die c_{uc} des Tensides können dem System im Feedstrom wieder zugeführt werden. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit umfaßten die Ultrafiltration zweier Enzymsysteme in einer Mikroemulsion, welche eine Bandbreite verschieden großer Moleküle umfaßten: Einerseits die Enzyme und inversen Mizellen, desweiteren Cofaktoren wie NAD^+ und $NADH$ sowie verschiedene Salze und Indikatoren unterschiedlicher Molmassen und Polarität.

Filtration des Oxidoreduktasesystems in Mikroemulsionen

Ein großer Vorteil der Ultrafiltration von enzymhaltigen Mikroemulsionen ist die Tatsache, daß aufgrund der oberflächenaktiven Tenside keine nachweisbare Adsorption der Enzyme an der Membran auftritt. Der Anteil der Enzyme, Cofaktoren und Salze im wäßrigen Anteil der Mikroemulsion kann, um im Einphasengebiet zu bleiben, einen Feststoffgehalt von ca. 2 Gew. % betragen. Der Volumenfluß durch die Membran wird dadurch, im Vergleich zur Ultrafiltration der Mikroemulsion ohne Reaktanden, nicht beeinflusst. Um eine vollständige Immobilisierung des Enzymsystems zu gewährleisten, muß der Rückhalt für alle an der Reaktion beteiligten Moleküle ermittelt werden. Es wurden daher Mikroemulsionen filtriert, die jeweils eine Komponente enthielten, für die der Rückhalt bestimmt werden sollte. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.44 dargestellt.

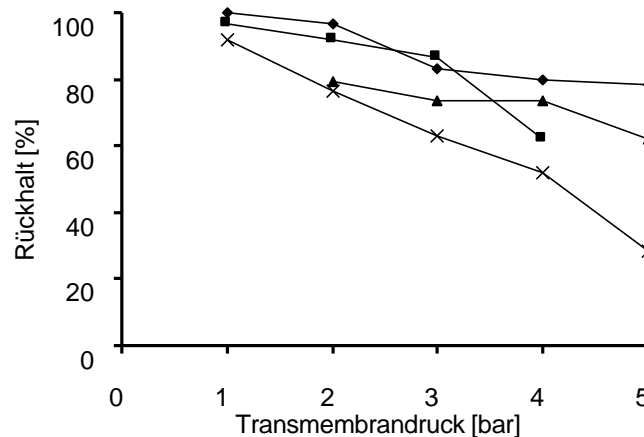


Abbildung 3.44: Rückhalt verschiedener Reaktionskomponenten bei der Filtration einer Mikroemulsion mit Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($\gamma = 0,15$ und $w_0 = 10$); (Δ) inverse Mizellen, (?) Bromkresolpurpur bei pH 1, (x) Bromkresolpurpur bei pH 13, (■) NADH

Da UF-Membranen mit molekularen Trenngrenzen < 20000 Da verwendet wurden, können die Enzyme die Membranen nicht passieren und so dem Reaktionsgemisch wieder zugeführt werden. So konnten die Enzyme FDH (MW 76 kDa) und ADH (MW 140 kDa) bei keinem angelegten Druck im Permeat nachgewiesen werden, was auf die enge Porengrößenverteilung der eingesetzten Membranen hinweist.

Der Cofaktor NADH (MW 702 Da) befindet sich aufgrund seiner Hydrophilie nur in den inversen Mizellen, d.h., daß er erst bei höheren Transmembrandrücken ($\Delta P > 1$ Bar) mit den inversen Mizellen durch die Poren gedrückt wird. Bis zu einem Transmembrandruck von 1 Bar ist das Enzymsystem mit dem Cofaktor vollständig immobilisiert. Die NADH - Rückhalte sind,

wie in Abb. 3.44 zu erkennen ist, gleich dem Rückhalt des Marlupal O13-60 (abgetoppt), das in den inversen Mizellen vorliegt.

Um den Fortschritt der Reaktion zu detektieren und zusätzliches Substrat zudosieren zu können, wird Bromkresolpurpur als pH-Indikator dem System zugegeben. Der Umschlagpunkt dieses Indikators liegt in der verwendeten Mikroemulsion im pH-Bereich zwischen $\text{pH} = 6,5$ und $\text{pH} = 8,5$. Um den genauen pH-Wert in den inversen Mizellen ermitteln zu können, muß der Wasser- und Tensidgehalt des Systems wohldefiniert sein, da sich sowohl das Absorptionsmaxima als auch der Umschlagpunkt des Indikators mit der Zusammensetzung der Mikroemulsion ändert. Zur Bestimmung des Rückhalts des Indikators und dessen konjugierter Base, wurden Mikroemulsionen mit stark saurem und stark alkalischem Wasser filtriert. Aus Abb. 3.44 ist zu erkennen, daß der Indikator mit saurem Wasser etwa die gleichen Rückhalte wie die inversen Mizellen der Mikroemulsion aufweist. Durch stark alkalisches Wasser sinken die Rückhalte jedoch merklich gegenüber den inversen Mizellen ab. Bis zu einem Transmembrandruck von 1 bar liegt der Rückhalt über 95% und somit noch in einem Bereich, der für den Betrieb eines kontinuierlichen Prozesses akzeptabel ist.

Das Edukt sowie das Produkt der enzymkatalysierten Reaktion liegt vollständig in der kontinuierlichen Ölphase der Mikroemulsion vor. Der Rückhalt für 2-Heptanon und auch 2-Heptanol lag bei allen angelegten Transmembrandrücken bei Null. Das Produkt der Reaktion kann daher durch die Ultrafiltration leicht vom Enzymsystem abgetrennt und durch eine Chromatographie weiter gereinigt, d.h. vom Tensid getrennt werden.

Die Enzymaktivität nimmt sowohl in wäßrigen Reaktionsmedien als auch in einer Mikroemulsion mit der Zeit ab. Der vollständige Rückhalt des Enzyms bedeutet für eine kontinuierliche Reaktionsführung eine zeitliche Limitierung der Reaktion aufgrund des Aktivitätsverlustes. Da für eine vollständige Immobilisierung des Enzymsystems ein Transmembrandruck von höchstens 1 bar angelegt werden darf, was für die Ultrafiltration von Makromolekülen ein vergleichsweise niedriger Druck ist, sollte für die Auslegung eines Enzym - Membran - Reaktors dieser Druck als Maximum gelten.

Filtration des Lipasesystems in Mikroemulsionen

Im zweiten untersuchten Reaktionssystem, bei dem die Trennung racemischen Menthols mittels Lipase-katalysierter Veresterung untersucht wurde, lagen die Rückhalte der Reaktionskomponenten ähnlich wie beim ADH / FDH System. So konnte das Enzym bei keinem angelegtem Druck im Permeat nachgewiesen werden. Ein Unterschied trat bei der Filtration des Propionsäureanhydrides auf. Dieser Befund liegt an der Verteilung des Propionsäureanhydrides

in den unterschiedlichen Kompartimenten der Mikroemulsion. Es stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen dem Öl und den inversen Mizellen der Mikroemulsion ein, so daß ein Teil des Propionsäureanhydrides nur zusammen mit den inversen Mizellen vom Enzym separiert werden kann, wie es in Abb. 3.45 dargestellt ist:

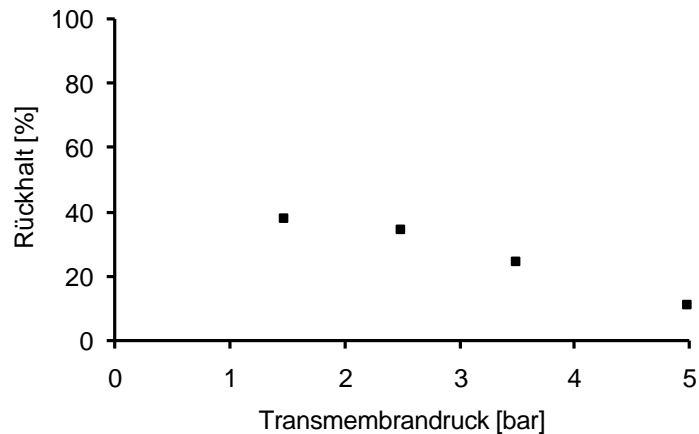


Abbildung 3.45: Rückhalt von Propionsäureanhydrid (10mM) bei der Filtration einer Mikroemulsion mit Marlupal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser ($\gamma = 0,15$ und $w_0 = 10$)

Während die Lipase aufgrund der Größe bei keinem angelegten Druck im Permeat nachgewiesen wurde, wird Propionsäureanhydrid, welches in der Mikroemulsion vorliegt, erst bei hohen Drücken vollständig im Permeat gefunden. Im Wesentlichen ist nur die Rückhaltung des Enzyms gewünscht. Der anzulegende Druck ($\gg 4$ bar) stellt daher kein Problem in der Reaktionsführung dar.

4 Reaktivmembranen^{*}

Durch die Vernetzung von Polymerlösungen lassen sich Membranen mit kontrollierten Stofftransporteigenschaften darstellen. Werden diese Membranen mit katalytisch aktiven Komponenten versetzt, lassen sich Stofftransportlimitierungen, die bei herkömmlich immobilisierten Katalysatoren ein Problem darstellen können, leicht unterdrücken, da der Stofftransport durch die Membran vorwiegend konvektiv verläuft. Das Verbundsystem Membran – Katalysator soll einerseits selektive Reaktionen ermöglichen, andererseits durch die Einstellung der Filtrationsparameter eine Stofftrennung von Produkt und Edukt (Feed- und permeatseitig) erlauben (*Beyer 1999, Orlich 1999 c*). Der wesentliche Vorteil der Verwendung einer Membran kann gegenüber Festbettreaktoren oder mikroverkapselten Katalysatoren (*Prüsse 1997*) in der verminderten Diffusionslimitierung liegen, wodurch der Katalysator einen größeren Wirkungsgrad hat. Erste denitrifizierende Membranen mit Palladium-Katalysatoren auf Polyvinylalkoholbasis für die Trinkwasserbehandlung wurden bereits entwickelt, und es konnte die gewünschte katalytische Aktivität nachgewiesen werden (*Lüdtke 1998, Orlich 1999 c*).

4.1 Polyvinylalkohol als Membranwerkstoff

Der Polyvinylalkohol - im Folgenden mit PVA abgekürzt - ist ein Polymer des in monomerer Form unbekannten Vinylalkohols. Seine Synthese gelang zum ersten Mal 1924 in den Laboratorien des Konsortiums für Elektrochemische Industrie in München durch Polymerisation von Vinylacetat zu Polyvinylacetat und anschließende alkalische Verseifung des Polyvinylacetats. Polyvinylalkohol ist unter den Markenbezeichnungen "Polyviol" oder "Mowiol" bekannt.

Die allgemeine Strukturformel von PVA ist in Abb. 4.1 wiedergegeben.

^{*} Teile dieses Kapitels wurden veröffentlicht in: B. Orlich, E. Kempin, K.-H. Reichert, R. Schomäcker; Darstellung von Reaktivmembranen auf der Basis von Poly (vinylalkohol); *Chem. Ing. Tech.* 2000, 72(10), 1209 - 1213

B. Orlich, E. Kempin, K.-H. Reichert, R. Schomäcker; Verfahren zur Herstellung einer Reaktivmembran; *Patentanmeldung* P199 43 728.9

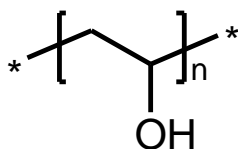


Abbildung 4.1: Allgemeine Strukturformel von PVA

Das n bezeichnet den Polymerisationsgrad und nimmt in der Regel Werte zwischen 100 und einigen 1000 an; das Molgewicht der Monomereinheit $[-\text{CH}_2 - \text{CHOH}-]$ beträgt 44 g. Einen entscheidenden Einfluß auf die Eigenschaften des Polyvinylalkohols übt dessen sterische Anordnung aus. Für die Primärstruktur kommen die folgenden Anordnungen in Frage: isotaktisch, syndiotaktisch und ataktisch. In der Reihenfolge ataktisch – syndiotaktisch – isotaktisch nimmt die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, zu, gleichzeitig nimmt in derselben Richtung die Kettenbeweglichkeit ab. Die geringste Wasserlöslichkeit weist hochgradig syndiotaktischer PVA auf. Der PVA hat ein typisches Verhalten gegenüber Lösungsmitteln. Ähnlich wie Zucker löst sich Polyvinylalkohol in organischen Lösungsmitteln nur in Ausnahmefällen (wie z.B. in DMSO), jedoch hervorragend in Wasser. Die Löslichkeit hängt allerdings von folgenden Faktoren ab :

- vom mittleren Molekulargewicht
- von der Temperatur des Lösungsmittels
- vom Gehalt an Acetylgruppen

Der Hydrolysegrad, der den Umwandlungsanteil von Acetatgruppen in Hydroxylgruppen angibt, beeinflußt die PVA-Löslichkeit und die Viskosität der Lösungen. In nur teilweise hydrolysiertem PVA ist die Wasserlöslichkeit höher, weil mehr Reste von Acetatgruppen bzw. weniger Hydroxylgruppen vorhanden sind, dadurch können weniger Polymer-Polymer-Wasserstoffbrückenbindungen untereinander gebildet werden. Die Polymer-Solvent-Wechselwirkung wird gefördert, und der PVA löst sich besser in Wasser. Die höhere Anzahl von Hydroxylgruppen in völlig hydrolysiertem PVA setzt die Wasserlöslichkeit herab, indem die Bildung von inter- und intramolekularen Polymer-Polymer-Wasserstoffbindungen gefördert, aber die Polymer-Solvent-Wechselwirkung unterdrückt wird. Um eine sinnvolle Lösegeschwindigkeit von PVA in Wasser zu erreichen, empfiehlt es sich, die Temperatur zu erhöhen. Der Grund hierfür ist, daß zunächst intermolekulare Polymer-Polymer-Wasserstoffbrückenbindungen gespalten werden müssen, bevor eine Solvation erfolgen kann. Die Anwendung von PVA als Membranwerkstoff für Parvaporationsmembranen hat sich mittlerweile etabliert (Waldburger 1996, Brannon 1987). Im Gegensatz hierzu ist die

Anwendung für poröse Membranen eher begrenzt. Bei sehr geringen Polymergehalten (*Na 2000*) oder durch die Verwendung spezieller Porogene während des Phaseninversionsprozesses (*Li 1995*), können Ultrafiltrationsmembranen unterschiedlichster Trenngüte hergestellt werden.

Herstellung und Charakterisierung von PVA – Membranen

Eine wäßrige PVA-Lösung, die mehrmals eingefroren und aufgetaut wird, bildet ein hochelastisches Gel. Dabei wird ein Sol-Gel-Phasenübergang durchlaufen, der ein thermoreversibles Gel erzeugt. In Wasser ist das PVA-Gel unlöslich, erfährt jedoch signifikante Quellungen. Das auf diese Weise hergestellte PVA-Hydrogel hat einzigartige Eigenschaften. Das Gel ist stabil bei Raumtemperatur, kann auf das 5- oder 6-fache seiner anfänglichen Länge ausgedehnt werden, behält jedoch seine ursprüngliche Gestalt. Dieses Verhalten deutet auf seinen Gummicharakter und seine hohe mechanische Stabilität hin. Seine Eigenschaften hängen von der Molmasse des Polymers, der Konzentration in der anfänglich verwendeten wäßrigen Lösung, der Einfriertemperatur und -dauer sowie der Anzahl der Einfrier-Auftau-Zyklen ab.

In der Literatur werden zwei grundlegende Modelle vorgeschlagen, um den Mechanismus dieser physikalischen Vernetzung zu erklären. Diese Modelle befassen sich mit der Wasserstoffbrückenbildung und der Polymerkristallitbildung bzw. der Bildung von mikrokristallinen Strukturen (*Kobayashi 1998, Mori 1997, Watase 1985*).

5 %ige PVA-Lösungen (MW 76kDa), die als dünner Film vergossen, physikalisch vernetzt werden, können als Membranen eingesetzt werden (die Synthese verschiedener PVA-Membranen sind im experimentellen Teil beschrieben). Die Struktur der Membranen ist oberflächlich teilweise kristallin, in der Bulk-Phase der Membranen zeigen sich jedoch eindeutig fibrogene Strukturen. Querschliffe und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranen, wie in der folgenden Abbildung 4.2 gezeigt, zeigen eine deutlich asymmetrische Struktur, welche aufgrund der unterschiedlichen Vernetzungsprozesse an der Oberfläche und in der Bulk-Phase aufgrund des Temperaturgradienten während des Einfrier-Auftau-Prozesses zustande kommen.

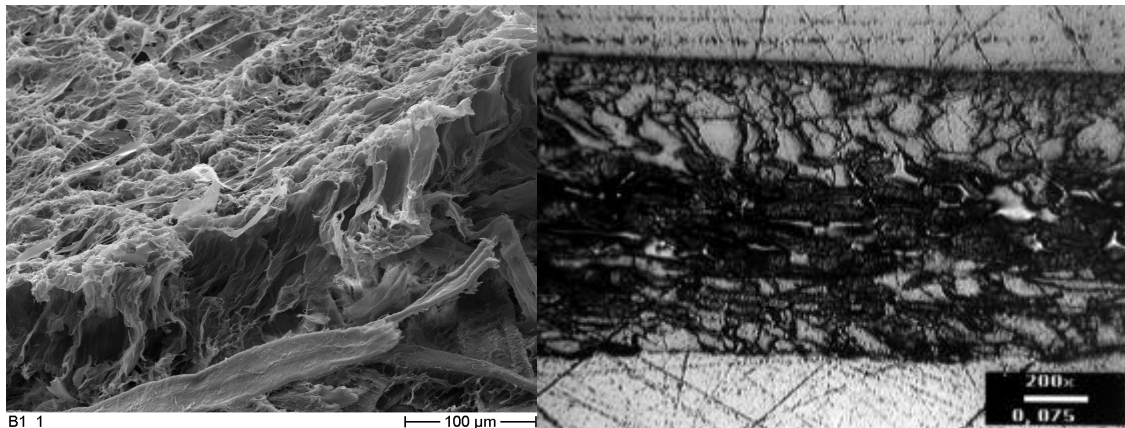


Abbildung 4.2: Anriß einer Membran und Querschliff durch eine PVA-Membran (5 %, 3 Auftau-Einfrierzyklen)

Die Membranen sind bis zu einer Schichtdicke von 500µm bei moderaten Drücken (0-10 bar Transmembrandruck) wasserdurchlässig, mit Membranwiderstandswerten, die im Bereich von Ultrafiltrationsmembranen liegen. Bei darüberliegenden Schichtdicken kommt es zu einem Porenverschluß. Dieser Porenverschluß tritt ebenso auf, wenn höherprozentige PVA – Lösungen zu Membranen mit Schichtdicken unterhalb 500 µm verarbeitet werden. Bereits bei 6 %igen PVA – Lösungen sind signifikante Volumenflußreduktionen bei niedrigen Drücken zu verzeichnen, die bei einer weiteren Erhöhung des Polymergehaltes sehr schnell zu einem Porenverschluß führen. Desweiteren ist ein Zusammendrücken des Membranmaterials zu verzeichnen, was zu keinem linearen Anstieg des Volumenflusses mit dem angelegten Druck, wie in Abb. 4.3 für niedrige Transmembrandrücke gezeigt, bei Transmembrandrücken oberhalb von 1,5 bar führt.

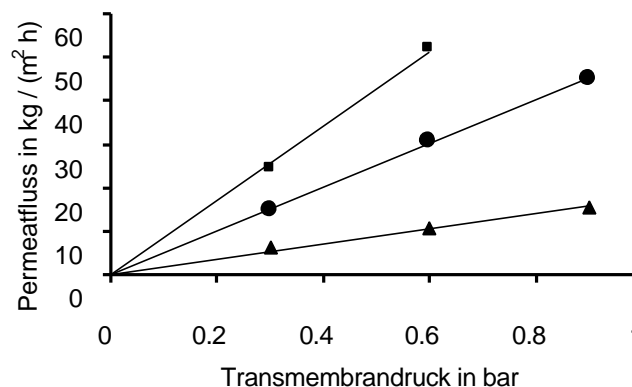


Abbildung 4.3: Volumenfluß in Abhängigkeit vom angelegten Transmembrandruck für 5 %ige physikalisch vernetzte PVA Membranen verschiedener Schichtdicke (□ 276 µm; ● 386 µm; ▲ 441 µm)

Die unterschiedlichen Volumenflüsse bei Verwendung verschieden dicker Membranen ist auf die Inhomogenität des Membranmaterials zurückzuführen, die sich gerade bei sehr dünnen

Von der chemischen Vernetzung von PVA – Lösungen mit Glutardialdehyd als Sythesemethode für Membranen wurde von vornherein Abstand genommen, da bekannt ist, daß mit dieser Methode keine reproduzierbaren Filtrationsmembranen erhalten werden (Persönliche Mitteilung von H. Brüscke, Sulzer Chemtech – Membrantechnik, Dechema Jahrestagung 1999). Als alternative Methode zur Herstellung von Filtrationsmembranen für die Katalyse wurde eine Kombination aus physikalischer und chemischer Vernetzung erprobt.

Bezüglich der Reaktivität verhält sich Polyvinylalkohol wie ein niedermolekularer, sekundärer Alkohol und kann auf Grund dieser Eigenschaft mit bifunktionellen Reagenzien, wie Dialdehyden, unter Zusatz eines Katalysators vernetzt werden. Die Vernetzung mit Glutardialdehyd (GDA) verläuft nach folgender Reaktionsgleichung:

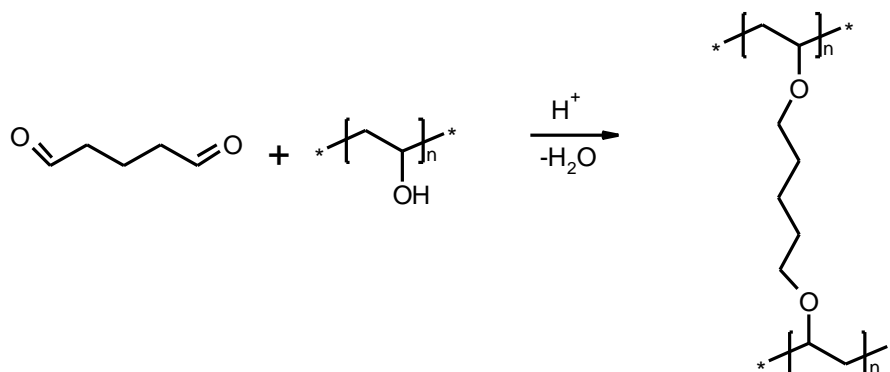


Abbildung 4.4: Säurekatalysierte Vernetzungsreaktion von PVA mit Glutardialdehyd

Prinzipiell könnte ein Mol eines bifunktionellen Reagenzes zwei Mol der Monomereinheit Vinylalkohols verknüpfen. Bei einer Konzentration von 1 Mol Dialdehyd pro zwei Grundmol PVA sollte demnach eine vollständige Vernetzung des Polyvinylalkohols eintreten.

Chemisch vernetzte PVA-Hydrogele haben eine kompaktere Netzwerkstruktur und geringere Kettenbeweglichkeit als die physikalisch vernetzten. Daraus folgt, daß die Menge an Wasser, die von der Membran adsorbiert werden kann, bzw. das Quellungsvermögen, sich verringert und das freie Volumen in der Membran ebenfalls abnimmt. Diese Tendenzen sind bei höherem Vernetzungsgrad noch ausgeprägter, was aufgrund einer dichteren Vernetzung in der Membran auch zu erwarten ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Membransynthese ist die Kombination der Vernetzung aus der chemischen Vernetzungsmethode mit Glutardialdehyd und der physikalischen Vernetzung durch Einfrier-Auftau-Zyklen. Das Aussehen des chemisch vernetzten PVA-Hydrogels ändert sich kaum, und das Gel zeigt eine gute Elastizität sowie mechanische Stabilität. Beim Erwärmen zeigt sich der Unterschied zwischen den physikalisch / chemisch und nur physikalisch vernetzten PVA-Hydrogelen. Das physikalisch vernetzte Gel geht sofort in Lösung, wenn es in kochendes Wasser eingetaucht wird während das mit Glutardialdehyd chemisch / physikalisch vernetzte PVA-Gel sich dagegen nicht in kochendem Wasser auflöst.

Die Charakterisierung, der durch die Kombination von physikalisch- und chemischer Vernetzung entstanden PVA-Membran, wurde mittels BET-Messungen, Durchflußmessungen sowie verschiedenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen vorgenommen. Hierbei sind folgende charakteristische Daten ermittelt worden:

Tabelle 4.1: Charakteristische Daten einer durch die Kombination von physikalisch- und chemischer Vernetzung entstanden PVA-Membran.

	Polyvinylalkohol
Polymergehalt	5 %
Porosität	95 %
Membranart	asymmetrisch
Membranwiderstand R_M	$1,7 \cdot 10^{11} \text{ m}^2 / \text{kg}$
spezifische Oberfläche S	$80 \text{ m}^2 / \text{g}$

Die BET - Messungen müssen innerhalb kürzester Zeit nach der Gefriertrocknung erfolgen, da das Material sehr hygroskopisch ist und die Membran nach 24h sichtbar schrumpft und Feuchtigkeit annimmt. Die eigentlich fibrogene Struktur fällt hierdurch zusammen. Neben 5 % igen PVA – Membranen ist die Oberfläche von 3 und 4 % igen Membranen bestimmt worden.

Hier zeigte es sich, daß mit zunehmendem Polymergehalt in der Syntheselösung die Oberfläche linear abnimmt (3% - 120 m²/g; 4% - 100 m²/g).

4.2 Immobilisierung von Lipase aus *Candida Rugosa* an PVA - Membranen

Aufgrund der hohen Stereoselektivität von *Candida Rugosa* Lipase bezüglich verschiedener Substrate, ist das Enzym von verschiedenen Forschern auf und in unterschiedlichen Materialien immobilisiert worden, um es für Reaktionen in organischen Lösemitteln bereitzustellen, die Stabilität zu erhöhen oder eine Wiederverwendung zu gewährleisten. Tab. 4.2 zeigt einen Ausschnitt von Materialien, auf denen CRL erfolgreich immobilisiert werden konnte:

Tabelle 4.2: Immobilisierung von *Candida Rugosa* Lipase auf verschiedenen Materialien

Material	Untersuchung	Ref.
Nylon	Lovastin (Cholesterin reduzierendes Medikament) Synthesen in org. Lösemitteln	Yang 1997
Polypropylen-Pulver	Adsorptionsbeschreibung (7 Lipasen) nach Langmuir; Einfluß der Adsorptionsbedingungen	Gitlesen 1997
Glycidylmethacrylat und Ethylenglycoldimethylacrylat	Kinetikuntersuchung; Hydrolyse von Palmöl in org. LM	Mojovic 1998
Polypropylen-Kappilarmembran (Mehrphasenmembranreaktor)	Darstellung langkettiger Fettsäuren (ab C ₁₄ mit dem Ziel mehrfach ungesättigtem C ₂₂ und C ₂₀)	Rice 1999
Polypropylen, PTFE und Cellulose-Kappilarmembran	Adsorptionsmodell für Enzyme (10 Lipasen), Math. Reaktormodellierung als PFTR-CSTR-Serienschaltung	Balcao 1996

Ein wesentliches Merkmal der CRL ist ihre Stereoselektivität in organischen Reaktionsmedien. Die Immobilisierung von Biokatalysatoren auf oder in PVA Netzwerken ist ein gut untersuchtes Gebiet. So wurde es zur Stabilisierung von Pilzkulturen bei der Produktion von Enzymen (Alekseiva 1998), in der Chromatographie zur Aufkonzentrierung von Enzymen (Battinelli 1996) und als äußerst reaktives Immobilisat für Enzyme (Chase 1998) verwendet. Die Enzymaktivität nach dem Immobilisierungsschritt überschreitet in wenigen Fällen 20 % der Ausgangsaktivität (verglichen mit den Enzymen in Lösung), was vor allem auf die verwendeten Mehrschritttechniken zurückzuführen ist. Speziell im Bereich der Entwicklung von Biosensoren hat sich jedoch PVA-Gel gegenüber anderen Gelen (Schneider 1996, Cicek 1998) als hervorragendes Immobilisat bewährt (Li 1998, Doretta 1997).

Einfluß des Syntheseweges verschiedener PVA - Membranen

Das immobilisierte Enzyme durch wiederholtes Spülen einer rein physikalisch vernetzten PVA-Membran an Aktivität verlieren, ist auch von anderen Gruppen beobachtet worden (*Doretti 1997*). Wesentlich hierbei ist jedoch der Aktivitätsverlust, der durch das Auswaschen des Enzyms mitsamt Membranmaterial vonstatten geht. Wird die Membran durch Glutardialdehyd (GDA) zunächst vernetzt und das Enzym anschließend adsorbiert, wird es durch die Filtration aus der Membran ausgewaschen. Nach einem Einschluß des Enzyms in das Membranmaterial während der Membranvernetzung mit GDA ist keine Aktivität messbar.

Als stabile Immobilisierungsart von CRL auf PVA-Membranen hat sich die kovalente Anbindung auf eine mit GDA vernetzte und durch einen einmaligen Einfrier-Auftau-Prozeß dargestellte Membran erwiesen. Die Reaktionsgleichung der kovalenten Anbindung des Enzyms ist in Abbildung 4.5 wiedergegeben:

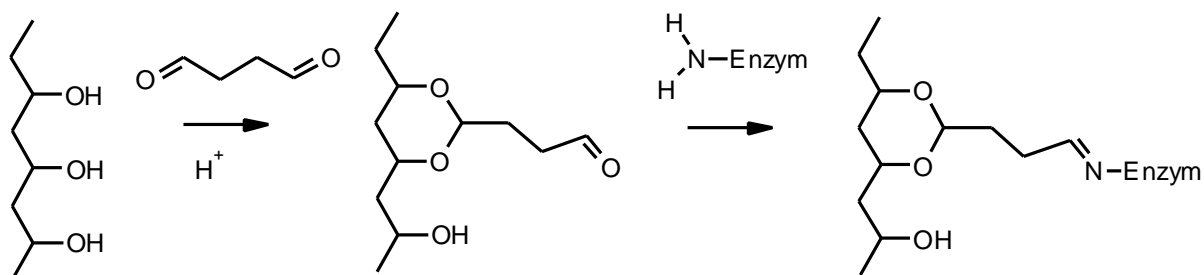


Abbildung 4.5: Kovalente Enzymanbindung eines Enzyms an ein PVA-Membran mittels Glutardialdehyd

Zusammenfassend werden die in dieser Arbeit untersuchten Immobilisierungsstrategien für CRL auf PVA-Membranen in Tabelle 4.3 gezeigt:

Tab 4.3: Immobilisierungsstrategien von CR-Lipase mit PVA-Membranen; wäßrige Reaktionsmedien;

Immobilisierung	Ergebnis
Adsorption auf Kryogelmembran	”Auswaschen” des Enzyms
Einschluß in Kryogelmembran	”Auswaschen” des Enzyms
Adsorption in GDA – Membran	”Auswaschen” des Enzyms
Einschluß in GDA – Membran	keine katalytische Aktivität des Enzyms
Einschluß Kryogel - GDA – Membran	keine katalytische Aktivität des Enzyms
kovalente GDA – Anbindung auf/in fertiger Kryogel - GDA – Membran	katalytische Aktivität – Ausbeutefaktor der Immobilisierung ca 80%

Lösemittelbeständigkeit der CR – Lipase immobilisiert auf PVA-Membranen

Da mit der immobilisierten CR- Lipase vor allem hydrophobe Substrate umgesetzt werden sollen, ist es sinnvoll, die Membran sowie die Enzymaktivität mit verschiedenen wasserhaltigen Lösemitteln zu testen. Hierfür wurden verschiedene physikalisch / chemische Membranen dargestellt und mit Enzym beladen (kovalent gebunden). Diese wurden hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Lösemitteln erprobt. Während die Membraneigenschaften (Beständigkeit, Widerstand) durch die Lösemittel unbeeinflusst blieben, wurde das Enzym durch die Lösemittel entweder vollständig deaktiviert oder zu großen Teilen inhibiert. In keinem Fall der verwendeten Lösemitteln konnte eine Aktivität der membrangebundenen Lipase nachgewiesen werden. Tabelle 4.4 zeigt einen Ausschnitt der Lösemittel, die im Falle von Lösemittel / Wassergemischen in einer großen Bandbreite von Mischungsverhältnissen getestet wurden (Mischungen von 1:4 bis 4:1):

Tab. 4.4: Konditionierung auf wasserhaltige, organische Lösemittel (Ausschnitt):

Lösemittel	Aktivität der Lipase nach Rückkonditionierung auf Wasser
Cyclohexan	ca. 50 % der Ausgangsaktivität (1h)
THF : Wasser 4:1	keine
Dioxan : Wasser 4:1	keine
Isopropanol : Wasser 4:1	keine
Aceton : Wasser 4:1	ca. 50 % der Ausgangsaktivität (ca. 30 min)
Marlipal O13-60 / Cyclohexan / Wasser ($\gamma=10$; $w_0=5$)	ca. 50 % der Ausgangsaktivität (ca. 30 min)

4.3 Reaktionen der *Candida Rugosa* Lipase immobilisiert auf einer PVA - Membran

Während bei den mittlerweile etablierten Enzym-Membran-Reaktoren die Membran als passive Barriere für die Rückhaltung des Enzyms und den Substrat- bzw. Produktaustausch oder als Matrix für ein Enzym zwischen wässriger und organischer Phase benutzt wird, sind die Zusammenhänge zwischen Reaktion und Transport in kovalent angebundenen Enzymmembranen, wie in Abb. 4.6 schematisch dargestellt, weitgehend unerforscht.

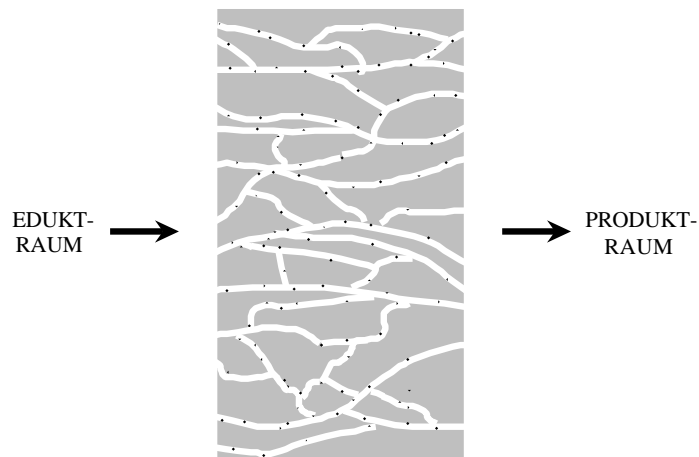


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung einer porösen Reaktivmembran

Bei der Verwendung katalytisch aktiver Komponenten, wie Enzymen, in einer Membranmatrix interessieren die Trenneigenschaften der eigentlichen Membran, d.h. die Stofftrennung aufgrund von Sieb- oder Lösegeschwindigkeitseigenschaften, nicht. Die Membran ist nur Träger des Katalysators, und die Stofftransporteigenschaften bestimmen die Kontaktzeiten zwischen dem Reaktanden und dem Katalysator. Dieses kann auch zur Produkt / Edukttrennung ausgenutzt werden, wenn durch die einstellbare Kontaktzeit das Edukt völlig am Katalysator reagiert und kein Edukt mehr in den Produktraum eintritt. In Abb. 4.7 ist dieses anhand verschieden großer Thiele-Module gezeigt:

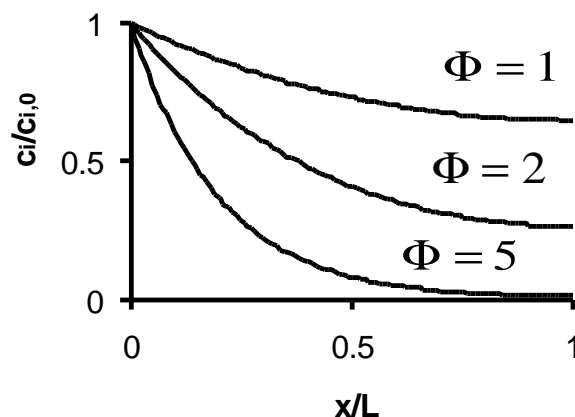


Abbildung 4.7: Darstellung der Konzentrationsprofile mit verschiedenen Thiele-Module (Φ) über die dimensionslose Länge (x/L) einer beliebigen Reaktivmembran

Die Einstellung der Kontaktzeit zwischen dem Katalysator und den Reaktanden kann auch dazu genutzt werden, Folgereaktionen zu unterdrücken. Im Falle von Enzymen ist dieses beim

Vorhandensein starker Produktinhibierungen von Nutzen, da das Produkt schnell von den katalytisch aktiven Zentren abtransportiert werden kann.

p-Nitrophenyllaurat Hydrolyse unter Verwendung einer CRL – Reaktivmembran

Wesentlichen Einfluß auf die Katalyse hat, wie zuvor beschrieben, die Synthesestrategie des Enzym – Membran – Verbundes. So kann das Enzym mittels Adsorption, Einschluß während der Vernetzung und mittels kovalenter Anbindung immobilisiert werden. Die Darstellung der PVA – Membran kann durch physikalische oder physikalisch – chemische Vernetzung reproduzierbar erfolgen.

Wird das Enzym, mittels Adsorption oder Einschluß, an eine durch rein physikalische Vernetzung dargestellte Membran immobilisiert, kommt es während der Filtration zu einem „Ausbluten“ des Enzyms, wie es in Abbildung 4.8b gezeigt ist. Bei der Immobilisierung durch Adsorption des Enzyms zeigt sich durch einen exponentiellen Abfall der Enzymaktivität, daß dieses u.U. zusammen mit dem Membranmaterial von der Membran heruntergespült wird.

Analog hierzu zeigt die, durch die gleichzeitige Vernetzung der Membran immobilisierte CRL, zunächst keine Aktivität, da die katalytischen Zentren nicht zugänglich sind (Abbildung 4.8b hinten). Da das Membranmaterial jedoch physikalisch vernetzt ist, ist die Membranstruktur nicht starr, sondern das Enzym wird allmählich freigesetzt, wobei auch Teile des Membranmaterials in Lösung gehen. Bis zu dieser Zeit kommt es zu einer starken Adsorption des Substrates PNPL im Membranmaterial (da PVA auch als Tensid wirkt), so daß die lokale Konzentration des PNPL im Membranmaterial eine höhere ist, als in der Feed-Lösung. Dadurch kommt es zu einer scheinbar sehr viel höheren Aktivität der CRL nach etwa einer Stunde. Im weiteren Filtrationsverlauf nimmt die Aktivität jedoch schnell aufgrund des Ausblutens des Enzyms aus dem Membranmaterial ab.

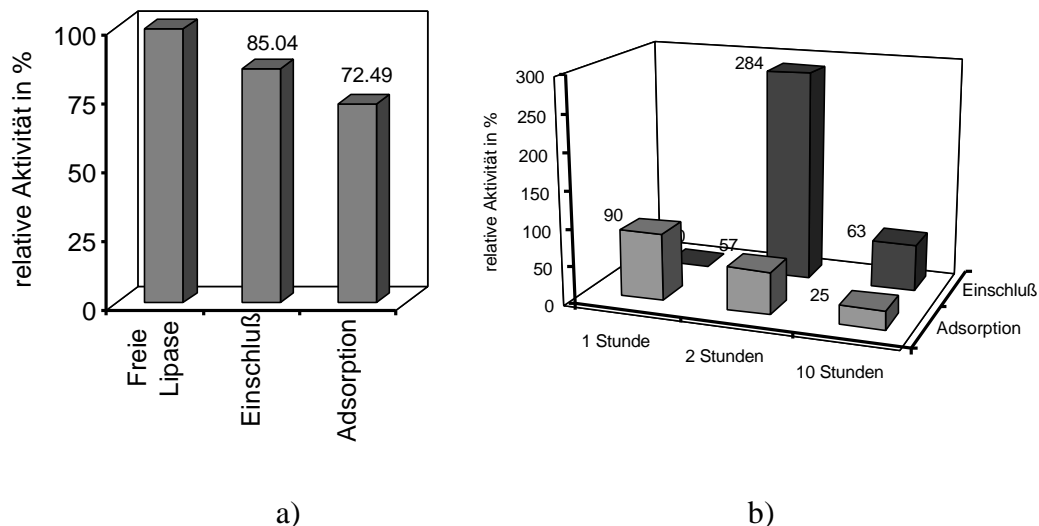


Abbildung 4.8: a) Ausbeutefaktor der Immobilisierung (über 10 Stunden gemittelte Aktivität) bezogen auf die Aktivität der freien CRL. b) Aktivität der CRL zu verschiedenen Zeitpunkten während der Filtration ($5 \text{ kg/m}^2 \text{ h}$) relativ zur freien Lipase.

Zu keinem Ausbluten des Enzyms kommt es, wenn das chemisch/ physikalisch vernetzte Membranmaterial kovalent mit dem Enzym verbunden ist. Um das Enzym kovalent anzubinden, muß es zunächst an die fertig vernetzte Membran adsorbiert werden. Anschließend wird es mit GDA kovalent an das Material angebunden. Das adsorbierte Enzym ist nicht nur auf der Oberfläche, sondern liegt auch in den Poren der PVA – Membran vor, wie erste Anfärbungsversuche mit Ninhydrin gezeigt haben.

Die am Membranmaterial immobilisierte CRL zeigt katalytische Aktivität bei der Hydrolyse von PNPL, die 70-80 % der Aktivität der freien Lipase entspricht. Dieser recht hohe Wert wird durch die vorangegangene Adsorption des Enzyms (vor der kovalenten Anbindung mit GDA) erklärt. Eine Oberflächenfunktionalisierung des PVA mit GDA und anschließender kovalenter Anbindung des Enzyms hat sich als schlecht reproduzierbar und zu geringen Aktivitäten führend erwiesen. Vermutlich reagiert das bifunktionelle GDA bereits zweimal mit dem PVA und es kommt daher zu einer sehr viel geringeren Anbindung des Enzyms.

In der dargestellte Reaktivmembran aus dem Verbund PVA – CRL kann der Umsatz der PNPL Hydrolyse durch die Filtrationsbedingungen gesteuert werden. Der wesentliche Parameter hierfür ist die Kontaktzeit zwischen dem Substrat und dem Enzym, welche über den angelegten Druck oder, wie hier gezeigt, über den Volumenfluß durch die Membran eingestellt werden kann. In Abb. 4.9 ist der vom Volumenfluß abhängige Umsatz der PNPL Hydrolyse dargestellt:

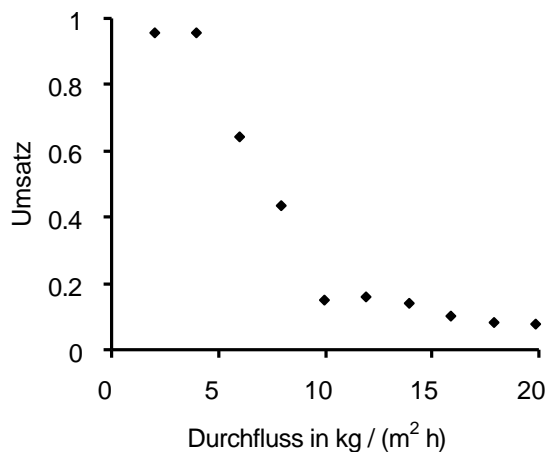


Abbildung 4.9: Umsatz der p-Nitrophenyllaurat – Hydrolyse (1mM) mit membrangebundener CR – Lipase in Abhängigkeit von der Durchströmgeschwindigkeit. (Enzymbeladung der Membran ca. $1,7 \times 10^6 \text{ U / m}^2$)

Mentholesterhydrolyse unter Verwendung einer CRL – Reaktivmembran

Da die membrangebundene CR-Lipase keine Aktivität bei der Verwendung organischer Reaktionsmedien aufweist, ist die enantioselektive Hydrolyse von racemischem Propionsäurementhylester in einer o/w – Mikroemulsionen als Reaktionsmedium untersucht worden. In diesem Reaktionsmedium liegt das Substrat als feinst verteilte Tropfen (mit einem Durchmesser unterhalb der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes) in einer wässrigen Pufferlösung verteilt vor. Zunächst wurde die Reaktion mit einer freien Lipase untersucht. Das Ergebnis der Esterhydrolyse ist in Abb. 4.10 dargestellt:

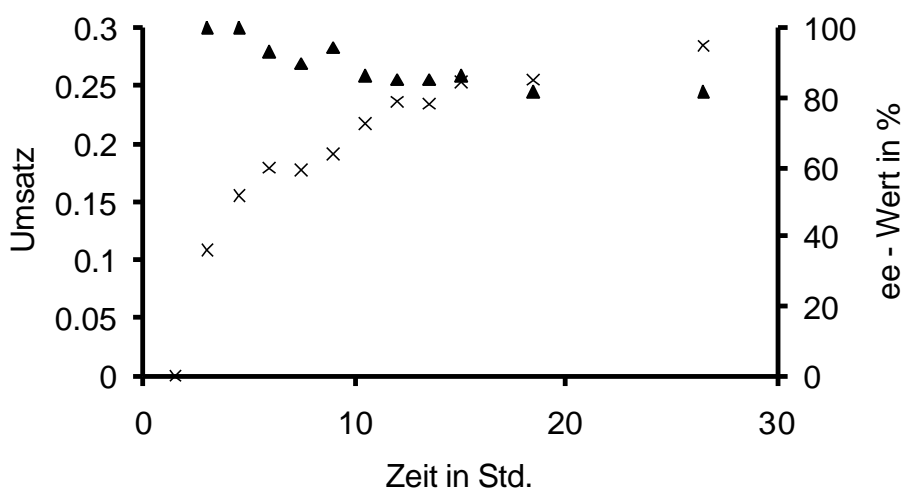
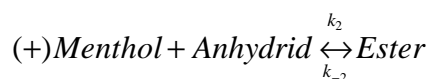
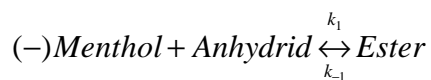


Abb. 4.10: Umsatz (X) und Enantiomerenüberschuß (?) der Propionsäurementhylester-hydrolyse (15,8 mmol/l) durch freie CR-Lipase (0,1 mg/ml) in einer o/w-Mikroemulsion (Glucopon 215 CS $\gamma=0,05$; $\alpha=0,0033$) bei 25°C und pH 8 (25mM Phosphatpuffer).

Wie aus Abb. 4.10 zu erkennen ist, sinkt der Enantiomerenüberschuß des Reaktionsproduktes mit der Zeit linear auf bis zu 80 % (27 h) ab. Dieses erklärt sich nur zum Teil durch die nichtkatalysierte, unspezifische Hydrolyse des Esters, welche nur in geringem Maße (nur qualitativ detektierbar) als Parallelreaktion auftritt. Aus der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ergibt sich eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $r_{\max} = 0,09 \text{ U/mg}$.

Kamiya und Goto haben festgestellt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei der CRL-katalysierten Veresterung von (+)-Menthol in reinen Alkanen etwa um den Faktor 1000 niedriger als für (-)-Menthol liegt (Kamiya 1997). Hierfür verglichen sie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 der Gleichgewichtseinstellungen für die beiden Mentholenantiomere bei der Veresterung mit Essigsäureanhydrid unter der Annahme, daß die Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen gleich sind:



Annahme : $k_1/k_{-1} = k_2/k_{-2}$

Dieses Ergebnis, welches in einer w/o-Mikroemulsion aufgrund der gesteigerten Aktivität der Lipase nicht bestätigt wurde (ee – Werte über 99% auch nach 100 h Reaktionszeit, siehe Kap. 3.3.2) kann hier zur Erklärung der verminderten Enantioselektivität bei der Verwendung von o/w-Mikroemulsionen herangezogen werden.

Bei der membrangebundenen Lipase liegen die Umsätze der Hydrolyse, verglichen mit der freien Lipase, nahezu gleich hoch, wie in Abb. 4.11 gezeigt ist. Die Enantiomerenüberschüsse liegen ebenso, wie bei Verwendung der freien Lipase, selbst bei hohen Umsätzen weit oberhalb 80 %.

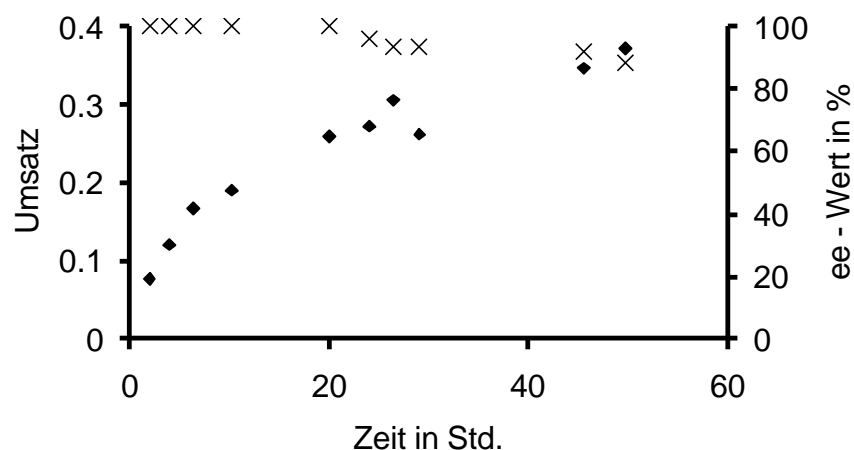


Abb. 4.11: Umsatz (◆) und Enantiomerenüberschuß (X) der Propionsäurementhylester-hydrolyse (15,8 mmol/l) durch membrangebundene CR-Lipase (0,1 mg/ml bezogen auf die Lösung; 3 mg pro 24,6 cm² Membran - 0,122 mg/cm² bezogen auf die Membran) bei Verwendung einer o/w-Mikroemulsion (Glucopon 215 CS $\gamma=0,05$; $\alpha=0,0033$) bei 25°C und pH 8 (25mM Phosphatpuffer) und einem Durchfluß von 0,25 kg/(m² h).

Der Aktivitätsverlust, der sich aufgrund der Immobilisierungsschritte ergibt, macht sich hier nicht bemerkbar. Aus der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ergibt sich, wie bei der freien Lipase, eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $r_{\max} = 0,09$ U/mg. Es konnte in Versuchen mit PNPL eine Immobilisierungsausbeute von bis zu 80 % nachgewiesen werden, jedoch ist dieser hohe Ausbeutefaktor von vielen Parametern, wie Temperatur, Immobilisierungszeit und Membranomorphologie abhängig, so daß er nur als Richtwert angesehen werden sollte. Im Falle der Mentholesterhydrolyse macht sich der Aktivitätsverlust nicht bemerkbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Immobilisierung nahezu ohne Aktivitätsverlust vonstatten geht.

5 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Strategien zu enzymkatalysierten Umsetzungen mit hydrophoben Substraten vorgeschlagen worden. Im Folgenden werden die einzelnen Konzepte diskutiert.

Reduktion prochiraler Ketone in w/o - Mikroemulsionen

Die Arbeiten zur Reduktion prochiraler Ketone mit Cofaktorregenerierung in w/o-Mikroemulsionen haben ein hohes Potential zur Verwirklichung einer konkurrenzfähigen Alternative zur Reduktionsreaktion in wäßrigen Reaktionsmedien aufgezeigt. Aufbauend auf der hohen Stabilität der Cofaktorregenerierung mit FDH in nichtionischen w/o-Mikroemulsionen konnten verschiedene Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reduktionen prochiraler Ketone durchgeführt werden.

Dadurch, daß die Enzyme und der Cofaktor innerhalb der inversen Mizellen vorliegen und die Reduktionsreaktion an der Grenzfläche stattfindet, können, bei ausreichender Enzymstabilität, höhere Zyklenzahlen des Cofaktors gegenüber wäßrigen Reaktionsmedien realisiert werden, da das NADH nur im wäßrigen Anteil der Mikroemulsion vorliegt. Die Immobilisierung des Cofaktors durch die Ultrafiltration eröffnet zusätzlich wirtschaftliches Potential, da eine geringere Membranfläche im Vergleich zu wäßrigen Reaktionsmedien (bei Verwendung einer Nanofiltration) zur Erreichung ausreichender Volumenflüsse benötigt wird.

Der für den wirtschaftlichen Erfolg maßgebende Schwachpunkt des Reaktionssystems ist die Stabilität der Alkoholdehydrogenasen. Dadurch, daß viele ADHs Halbwertszeiten von wenigen Stunden in Mikroemulsionen aufweisen, sind Synthesen in den Mikroemulsionen nur bis zu geringen Umsätzen und für eine sehr begrenzte Zeit möglich. Die Arbeiten mit *HLADH* haben jedoch gezeigt, daß das Stabilitätsproblem nicht für alle Alkoholdehydrogenasen gegeben ist. Ein weiteres Screening verfügbarer Alkoholdehydrogenasen könnte ein breiteres Substratspektrum für Reduktionen in Mikroemulsionen eröffnen.

Die Enzymverfügbarkeit von FDH und auch ADH ist ein äußerst wichtiger Faktor, wenn die Synthesen in einem wirtschaftlich sinnvollen Rahmen durchgeführt werden sollen. Hierbei spielt die Konzentration der Enzyme in den inversen Mizellen eine große Rolle, um in erreichbaren Zeiten zu möglichst hohen Umsätzen, auch bei hohen Ketonkonzentrationen, gelangen zu können. Die Entwicklung von rekombinanten Enzymen und von Aufarbeitungsmethoden, wie z.B. der Affinitätschromatographie für NADH-abhängige Enzyme,

könnten die Problematik geringer Enzymverfügbarkeit verringern. So wird z.Z. am FZ-Jülich an einer rekombinaten *CPCR* gearbeitet, deren Aufkonzentrierung bis zu 2000 U/mg gelungen ist.

Racemattrennung mit Lipasen in w/o - Mikroemulsionen

Racemattrennungen hydrophober Alkohole durch Lipase-katalysierte Veresterungen mit Säureanhydriden sind in w/o-Mikroemulsionen auch mit hohen Substratkonzentrationen möglich. Lipasen besitzen in diesen Reaktionsmedien eine auffallend hohe Stabilität, so daß im Falle von hohen Wertschöpfungen, d.h. vor allem bei ausreichenden Enantiomerenüberschüssen, gute Ausbeuten erreicht werden können. Die Aktivität der Lipasen kann unabhängig vom Tensidgehalt durch einen geringen Wassergehalt gegenüber wäßrigen, tensidhaltigen Reaktionsmedien noch zusätzlich gesteigert werden.

Wesentlicher Nachteil der Racemattrennung ist die Übersäuerung des Reaktionsmediums durch die freiwerdende Säure, was jedoch durch eine ausreichend starke pH-Wert-Pufferung umgangen werden kann.

Die Ultrafiltration von w/o – Mikroemulsionen in der Biokatalyse

Die Ultrafiltration von Mikroemulsionen hat sich als sinnvolle Operation für die Immobilisierung von Biokatalysatoren und zur Produktisolierung erwiesen. Auch für andere temperaturempfindliche Moleküle in Mikroemulsionen, ob Enzyme oder anorganische Katalysatoren, ist die Ultrafiltration eine gute Möglichkeit zur Aufkonzentrierung oder für eine kontinuierliche Prozeßführung in der Katalyse. Da die Enzymaktivität sowohl in wäßrigen Reaktionsmedien als auch in einer Mikroemulsion mit der Zeit abnimmt, bedeutet der vollständige Rückhalt der Enzyme und der Cofaktoren für eine kontinuierliche Reaktionsführung eine zeitliche Limitierung der Reaktion nur aufgrund des Aktivitätsverlustes.

Um die einphasige Mikroemulsion nach einer Reaktion wieder in Wasser und Öl zu separieren, kann auch eine Temperaturerhöhung oder Erniedrigung zur Phasentrennung angewendet werden. Dieses ist im Falle von Enzymen in der Mikroemulsion nur in begrenztem Rahmen möglich, da die Enzyme bei hohen Temperaturen schnell denaturieren und die Phasentrennung zudem sehr langsam und oft auch unvollständig verläuft. Die Ultrafiltration der Mikroemulsion ist eine Trenntechnik, die sich durch eine hohe Geschwindigkeit und einen besonders schonenden Umgang mit dem Reaktionsgemisch auszeichnet. Sie ist daher gegenüber der temperaturinduzierten Phasentrennung die sinnvollere Methode bei der Verwendung von Enzymen.

Reaktivmembranen auf der Basis eines Enzym – Membran - Verbundes

Wie in dieser Arbeit gezeigt, erfordert die Ausnutzung des Potentials von Enzym-Reaktivmembranen die aufeinander abgestimmte Optimierung aller wesentlichen Parameter, insbesondere der Charakterisierung der Membranen, der Immobilisierungsstrategien und -methoden sowie der Katalyse / Reaktionsbedingungen. Die vorgestellte Reaktivmembran ist für Reaktionen mit nichtwässrigen Reaktionsmedien und als Trennmembran für eine organische und eine wässrige Phase ungeeignet. Somit sind nur Reaktionen mit hydrophoben Substraten in o/w-Mikroemulsionen möglich, wie es für die PNPL-Hydrolyse als Modellreaktion gezeigt wurde. Das Membranmaterial PVA bietet für die Enzymkatalyse trotzdem eine gute Grundlage zur Immobilisierung von Biokatalysatoren. Daher sollten weitergehende Arbeiten, mit PVA als Membranmaterial, andere Enzyme zur Immobilisierung oder auch andere Applikationsrichtungen, wie die Biosensorik, zum Ziel haben.

Die Immobilisierung von Enzymen an Filtrationsmembranen ist nur bei spezifischen Enzym-Substrat-Systemen sinnvoll. Wesentliche Voraussetzung für das System ist eine extrem hohe Produktinhibierung des Enzyms, dem durch die Kontaktzeit zwischen Enzym und Substrat und dem damit verbundenem konvektiven Abtransport des Produktes, entgegengewirkt werden kann. Die Kontaktzeit kann durch die mittlere Verweilzeit des Substrates in der Membran gesteuert werden, die wiederum durch die Filtrationsbedingungen einstellbar ist. Die in dieser Arbeit gezeigte Immobilisierung von CR-Lipase an einer Filtrationsmembran zur Esterhydrolyse ist keine enzymtechnisch sinnvolle Reaktorkonfiguration, bietet jedoch Grundlagen für die aufgezeigten Anwendungsmöglichkeiten einer Reaktivmembran.

6 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Entwicklung und Nutzung von Enzym-Membran-Systemen zur Umsetzung hydrophober Substrate mit Tensiden als Hilfsmitteln.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Enzymkatalysierte Reduktion prochiraler Ketone in w/o-Mikroemulsionen

Auf der Basis des Enzyms Formiatdehydrogenase wurde eine effektive Cofaktorregenerierung in nichtionischen w/o-Mikroemulsionen entwickelt, welche als Grundlage für Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reduktionen diente. Bei etwa gleich hoher Stabilität der Formiatdehydrogenase in Wasser und w/o-Mikroemulsionen wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Cofaktorregenerierung in den Mikroemulsionen um den Faktor 40 geringer als in Wasser ermittelt.

Durch einen Vergleich der Kinetik bei der Reduktion von 2-Heptanon mit hohen Substratkonzentrationen mit *Yeast* Alkoholdehydrogenase in Wasser und w/o-Mikroemulsion konnte eine um 12-fach erhöhte Aktivität in w/o-Mikroemulsion ohne Produktinhibierung ermittelt werden. Aufgrund einer sehr geringen Stabilität der *Yeast* Alkoholdehydrogenase in w/o-Mikroemulsionen wurden weitere Alkoholdehydrogenase auf ihre Aktivität und Stabilität in Mikroemulsionen untersucht. Die Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchungen von Carbonyl Reductase aus *Candida Parapsilosis* und *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase im Zusammenhang mit den Zusammensetzungen der Mikroemulsionen ergaben hohe Stabilitäten in w/o-Mikroemulsionen. So konnte für die *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase kein Aktivitätsverlust auch nach mehreren Monaten detektiert werden. Auf der Basis einer photometrischen pH-Wert-Messung durch Bromkresolpurpur konnte daher die Reduktion verschiedener Ketone in Mikroemulsionen durchgeführt werden. Die Reduktion von Aceton durch *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase konnte mit den höchsten Umsätzen und einer hohen Zyklenzahl (ttn = 2029) durchgeführt werden. Auf der Basis kinetischer Untersuchungen des Reaktionssystems zur Reduktion von 2-Butanon mit *Horse Liver* Alkoholdehydrogenase und Carbonyl Reductase aus *Candida Parapsilosis* wurden Feed-Batch Versuche bis zu einem vollständigen Umsatz durchgeführt.

Lipase-katalysierte Racemattrennung

Die Charakterisierung der Reaktion von *Candida Rugosa* Lipase mit einem Modells substrat in w/o-Mikroemulsion ergab eine erhöhte Aktivität bei geringen Wassergehalten unabhängig vom Tensidgehalt der Mikroemulsionen. Auf der Basis kinetischer Untersuchungen konnte die Mentholveresterung in Feed-Batch Versuchen mit einem absoluten Enantiomerenüberschuß bei relativ hohen Umsätzen (bis 25 %) durchgeführt werden.

Entwicklung eines Enzym – Membran - Reaktors bei der Verwendung von Mikroemulsionen als Reaktionsmedium

Die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Druck, Rückhalt und Permeatfluß bei der Filtration von w/o-Mikroemulsionen führte zur Auslegung eines Enzym-Membran-Reaktors im Labormaßstab. Durch Grundlagenuntersuchungen zur Adsorption von nichtionischen Tensiden an Ultrafiltrationsmembranen konnte der Permeatfluß modelliert werden.

Der nachgewiesene vollständige Rückhalt der enzymatischen Reaktionssysteme in Mikroemulsionen zur Produktisolierung und Katalysatorimmobilisierung an Ultrafiltrationsmembranen kann die Grundlage für den Aufbau eines kontinuierlichen Prozesses liefern.

Darstellung einer Enzym – Reaktivmembran

Auf der Basis der Synthese und Charakterisierung von Poly(vinylalkohol)-Membranen gelang die Darstellung des katalytisch aktiven Enzym-Membran-Verbundes durch kovalente Anbindung von *Candida Rugosa* Lipase. Bei der Hydrolyse von pNitrophenyllaurat in Abhängigkeit von der Kontaktzeit mit dem Membranverbund wurde eine hohe Aktivität bei einer hohen Kontaktzeit Enzym-Substrat (niedriger Volumenfluß durch die Membran) festgestellt. Die enantioselektive Mentholesterhydrolyse in o/w-Mikroemulsionen gelang mit hohen Enantiomerausbeuten (ee >80 % auch bei Umsätzen über 25 %) sowohl mit freier Lipase als auch mit dem Enzym-Membran-Verbund. Der Enzym-Membran-Verbund zeichnete sich durch eine hohe Stabilität (Enzymaktivität auch nach einigen Wochen Standzeit) sowie ein hohen Enzymausbeutefaktor während der Immobilisierung aus.

7 Material und Methoden

Verwendete Geräte und Chemikalien

Verwendete nichtionische Tenside und ihr mittlerer Ethoxilierungsgrad

Brij und Myrj sind Markennamen von ICI-Surfactants (USA). Glucopon ist ein Markenname der Fa. Henkel. Marlipal ist ein Markenname der Fa. Condea Chemie GmbH. Die Kettenlänge des Fettalkohols und der Ethoxylierungsgrad sind gemittelte Zahlen der technischen Tenside. Marlipal O13-60 (abgetoppt) unterscheidet sich zu dem einfachen Marlipal O13-60 dadurch, daß durch einen Filmverdampfer der Überschuß Tridecanol im Tensidgemisch entfernt wurde. Dieses war nötig, da das Isotridecanol durch ADHs oxidiert werden kann, und mit nicht abgetoppten Marlipalen so keine verlässliche Aussage zur Kinetik erreichbar ist. Das Entfernen des Isotridecanols mittels eines Filmverdampfers erfolgte durch die Condea Chemie GmbH in Marl.

Tabelle 7.1: Kommerzielle Tenside; C_xE_y : X = Anzahl der C-Atome im Fettalkohol, Y = Ethoxylierungsgrad; G = Glucose; Ph= Phenol

Tensid, Kommerzieller Name	Fettalkohol Ethoxylierungsgrad
Marlipal O13 40	C13 E4
Marlipal O13 60	C13 E6
Marlipal O13 60 abgetoppt	C13 E6 ohne C13-Alkohol
Marlipal O13 80	C13 E8
Marlipal O13 100	C13 E10
Brij 30	C12 E4
Brij 35	C12 E30
Brij 52	C16 E2
Brij 56	C16 E10
Brij 58	C16 E20
Brij 72	C18 E2
Brij 76	C18 E10
Brij 78	C18 E20
Brij 700	C18 E100
Brij 92	C18 E2
Brij 96	C18 E10
Myrj 45	C18 E8
Myrj 49	C18 E20
Myrj 51	C18 E30
Myrj 52	C18 E40
Myrj 53	C18 E50
Triton X 100	C9 Ph E9
Glucopon 215 CS	C8 G1
Igepal CA 520	C9 Ph E5
Tween 40, Tween 60, Tween 80, Tween 85 (Fluka)	unterschiedlich ethoxilierte und mit Fettalkoholen veretherte Sorbitane

Verwendete Lösemittel

Tabelle 7.2 Verwendete Lösemittel

Lösemittel	Hersteller	Reinheit / Konzentration
Aceton	Merck	> 99 %, technisch
Cyclohexan	Merck	p.a.
Oktan	Fluka	zur Synthese
Isooktan	Merck	zur Synthese
2-Propanol	Merck	> 99 %, technisch

Verwendete Substrate & Chemikalien

Tabelle 7.3: Verwendete Substrate & Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit / Konzentration
2-Heptanon	Aldrich	98 %
2-Heptanol	Merck	> 99 %
2-Oktanon	Fluka	> 97 %
2-Butanon	Fluka	> 99,5 %
2-Butanol	Sigma	> 99,5 %
(-)-Menthol	Fluka	>99 %
rac. Menthol	Fluka	> 99 %
Acetophenon	Fluka	> 98 %
2-Phenyletanol	Aldrich	98 %
ABEE	Aldrich	98 %
Natriumformiat	Merck	p.a.
Ameisensäure	Merck	98 – 100 %
Propionsäureanhydrid	Merck	> 98 %
Phosphorsäure	Fluka	85 %
Salzsäure	Fluka	37 % (rauchend)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	p.a.
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	p.a.
Poly vinylalkohol 72000	Merck	zur Synthese (Hydrolysegrad > 98 %)
p-Nitrophenyllaurat	Sigma	100 %
Bromkresolpurpur	Fluka	o.A.
Pufferstandards	Merck	Phosphatpuffer

Verwendete Biokatalysatoren

Tabelle 7.4: Verwendete Biokatalysatoren

Enzym	Hersteller – Anbieter	Reinheit
YADH	Fluka	260 U/mg
YADH	Boeringer	0,3 U/mg
HLADH	Fluka	0,3 U/mg
CPCR	Jülich-Enzyme-Products; Eigenaufarbeitung	3,6 U/ml ; 40 U/mg
FDH	Jülich-Enzyme-Products	81 U/ml ; 36 mg/ml
CRL	Sigma	60000 U/mg
NADH & NAD ⁺	Fluka	> 97 %
BSA Fraktion 5	Sigma	96 %
Bakers Yeast	Sigma	Trockenmasse

Analysen

Verwendete Analysegeräte

Zur Messung der Extinktionen wurde das Photometer UVIKON 943 der Firma Kontron Instruments (jetzt: Bio-Tek Instruments) verwendet. Bei NADH-abhängigen Enzymreaktionen wurde die NADH-Bande bei 340 nm [Konzentrationsberechnung nach Lambert-Beer mit $\epsilon = 6220 \text{ l}/(\text{mol cm})$] zeitlich verfolgt (Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für Kinetikuntersuchungen: Zeit, je nach Enzymkonzentration, von 30 sec. bis zu 5 min.). Bei Verwendung von Nonylphenolen oder Acetophenon wurde die NADH-Absorption bei 370 nm [$\epsilon = 2985 \text{ l}/(\text{mol cm})$] oder 380 nm [$\epsilon = 1309 \text{ l}/(\text{mol cm})$] zeitlich verfolgt. Für große Ansätze (wie im Falle der Ganzzellenumsetzungen) wurde eine vom Gerät abgekoppelte Lichtleitereinheit mit Tauchsonde der Fa. Hellma in einem mit schwarzer Folie lichtgeschützten 100 ml Reaktor verwendet.

Für Messungen mit p-Nitrophenolderivaten wurde teilweise das UVIS-Einstrahlphotometer „VISI-DUO“ der Fa. Latex zur Online-Detektion verwendet (Reaktivmembranversuche).

Die GC Messungen erfolgten mit einer chiralen Säule (CP - Cyclodextrine B236M19 50m 0,25mm – Chrompack, Niederlande) mit He als Trägergas und FID-Detektion. Hierfür wurde ein „HP5880 Series GC“ der Fa. Hewlett Packart verwendet. Um die Enantiomere sekundärer Alkohole (Ausnahme: Menthol) mit diese Säule zu trennen, war es nötig, sie zu derivatisieren. Hierzu wurde jeweils 1 ml der Probe mit 1 ml Essigsäureanhydrid für 1 h auf 100 °C erhitzt. Die Umsatzbestimmungen wurden durch den Vergleich der Flächenprozentage von Substrat und Produkt durchgeführt. Für die einzelnen Trennungen wurden folgende Temperaturprogramme verwendet:

Heptanon, Oktanon, Acetophenon:

10 min isotherm bei 50°C, anschließend eine Temperaturrampe mit 5°C/min auf 180°C.

Typische Retentionszeiten am Beispiel Heptanon:

24,8 min S-(+)-2-Heptanol-ester

25,6 min R-(-)-2-Heptanol-ester

Propionsäurementhylester

10 min isotherm bei 90°C, anschließend eine Temperaturrampe mit 1°C/min auf 150°C.

Typische Retentionszeiten:

40,9 min (Propionsäure-(+)-menthylester)

40,1 min (Propionsäure-(-)-menthylester).

- Die Dichtemessungen von Mikroemulsionen erfolgten mittels einfacher Spindeln (Hersteller unbekannt) in temperierten Lösungen.
- Viskositätsmessungen erfolgten mit einem temperierten Viskosimeter aus Glas nach Ubbelohde.

Methoden und Experimente

Aufreinigung der CPCR:

Nach der Zellernte erfolgt ein Aufschluß durch Naßvermahlen mit Glasperlen. Eine anschließende PEG-Fällung läßt im ersten Schritt neben Zelltrümmern auch noch einen Teil der Begleitproteine und Nucleinsäuren ausfallen. Aufgrund der geringen Stabilität des Enzyms ist eine anschließende Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose notwendig. Die Elution der beladenen Säule wird mittels eines Stufengradientes an Salzspülungen bewerkstelligt. In der ersten Stufe wird Begleitprotein abgelöst, in der zweiten Stufe das aktive Protein, während die dritte Stufe zur Säulenspülung verwendet wird. Abbildung 7.1 zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufs.

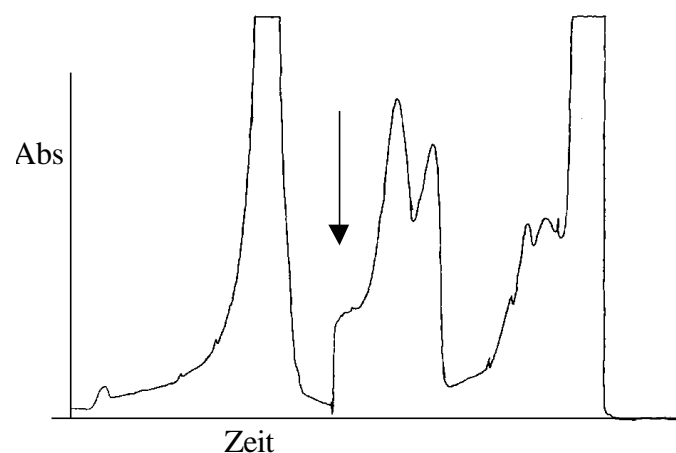


Abbildung 7.1: Elutionsprofil (256 nm) des Säulenlaufs. Der Proteinpeak der CPCR ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Aus den gesammelten Fraktionen wurde das Enzym nach einer Aufkonzentrierung durch eine Ultrafiltration mit einer Aktivität von 3,6 U/ml (Reduktion des Stammsubstrates ABEE, entspricht 4 U/ml bezogen auf das in dieser Arbeit verwendete Substrat 2-Butanon) nachgewiesen. Die Ausbeute nach der Aufreinigung (ca. 60-fache Aufreinigung) betrug ca. 100 U (ca. 70 % bezogen auf das Rohextrakt) d.h. die gewonnene Enzymlösung enthält noch ca. 98 % Fremdproteine (die genaue Aufreinigungsprozedur mit Konzentrationsangaben der Salzgradienten findet sich u.a. bei *Rissom 1999*).

Die Ultrafiltrationsapparatur

Die temperierbare Filtrationszelle (cross-flow-Filtration), eine Entwicklung des Forschungszentrums Jülich (kommerziell erhältlich bei Bioengineering, Wald – Schweiz), wird durch eine druckerzeugende HPLC-Pumpe (Knauer HPLC Pump 64) in einer Schleife des Reaktors betrieben, wie es in Abb. 7.2 schematisch dargestellt ist. Zur Temperierung wurde ein Julabo SC Thermostat verwendet. Das Druckhalteventil (SS-RL-3-S4) und der Mikrofilter (SS-4-TF2) sind von der Fa. Nupro (bei Enzymmessungen wurde kein Mikrofilter verwendet).

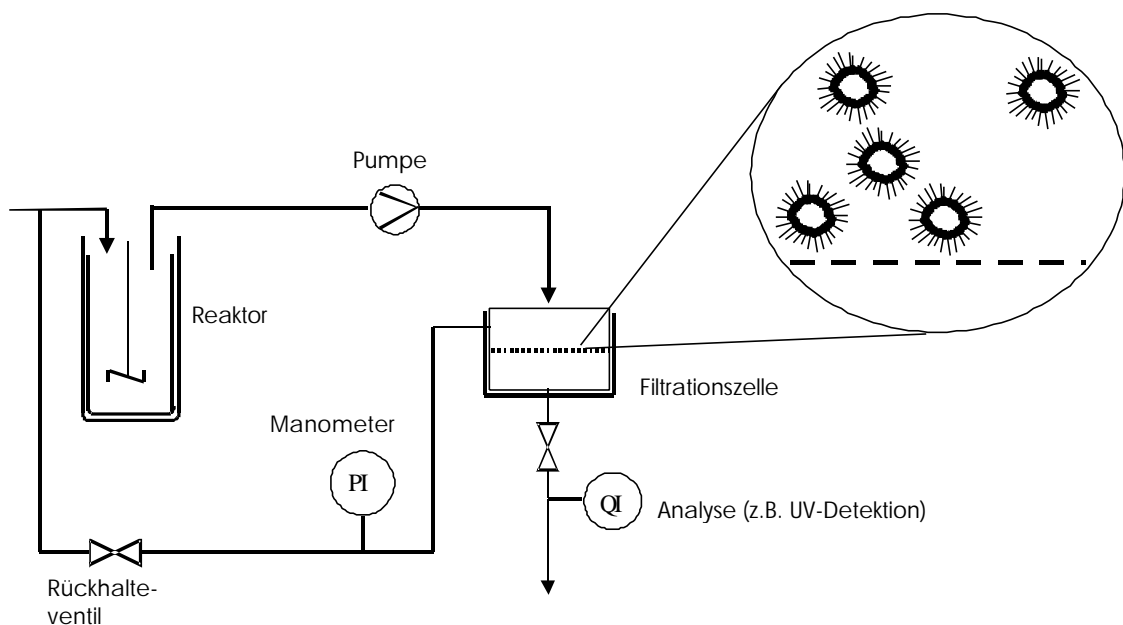


Abbildung 7.2: Fließschema des Enzym-Membran-Reaktors

Das Volumen der gesamten Schleife (incl. Permeatseite) beträgt 17 ml, der Druckverlust durch die Rohre und Apparate liegt bei den höchsten Durchsätzen noch unter 0,1 Bar und kann daher vernachlässigt werden.

Die Tensidbestimmung von Nonylphenoltensiden wurde in 3 ml Quarzglasküvetten mit dem Uvikon 943 UV-Spektrometer der Fa. Kontron vorgenommen. 20 µl Mikroemulsion mit Nonylphenoltensiden wurden in 3 ml Ethanol gelöst und die Peakfläche zwischen 245 und 295 nm ausgewertet. Für die AOT Bestimmung wurden 100 µl AOT-Mikroemulsionen in 3 ml Ethanol gelöst und die Peakhöhe bei 221,5 nm ausgewertet. Alle anderen ionischen und nichtionischen Tenside wurden durch gravimetrische Messungen quantifiziert. Hierfür wurden die Proben gefriergetrocknet (Gefriertrockner alpha, Fa. Christ).

Als Alternative zur gerührten UF-Zelle wurde eine Cross-Flow-Filtrationszelle aus Edelstahl entworfen und getestet. Die Cross-Flow-Filtrationszelle für runde Flachmembranen (Durchmesser 76 mm), mit einer Kanalhöhe von 1 mm und einer Stromführung von außen nach innen, gewährleistet bei einer Überströmgeschwindigkeit von etwa 0,5 m/s (Pumpenleistung der Schleife ca. 80 ml/min) und einer bei konditionierten UF - Membranen gegebenen starken Rauigkeit (AFM – Aufnahmen zeigen Rauigkeiten im Bereich von $r_{\text{ms}} = 15$ nm) ausreichend hohe Reynoldszahlen, so daß dem Fouling durch Ablagerungen an der Membranoberfläche gut entgegengewirkt werden kann. Das verwendete Material ist autoklavierbar und somit auch für die Biotechnologie gut geeignet.

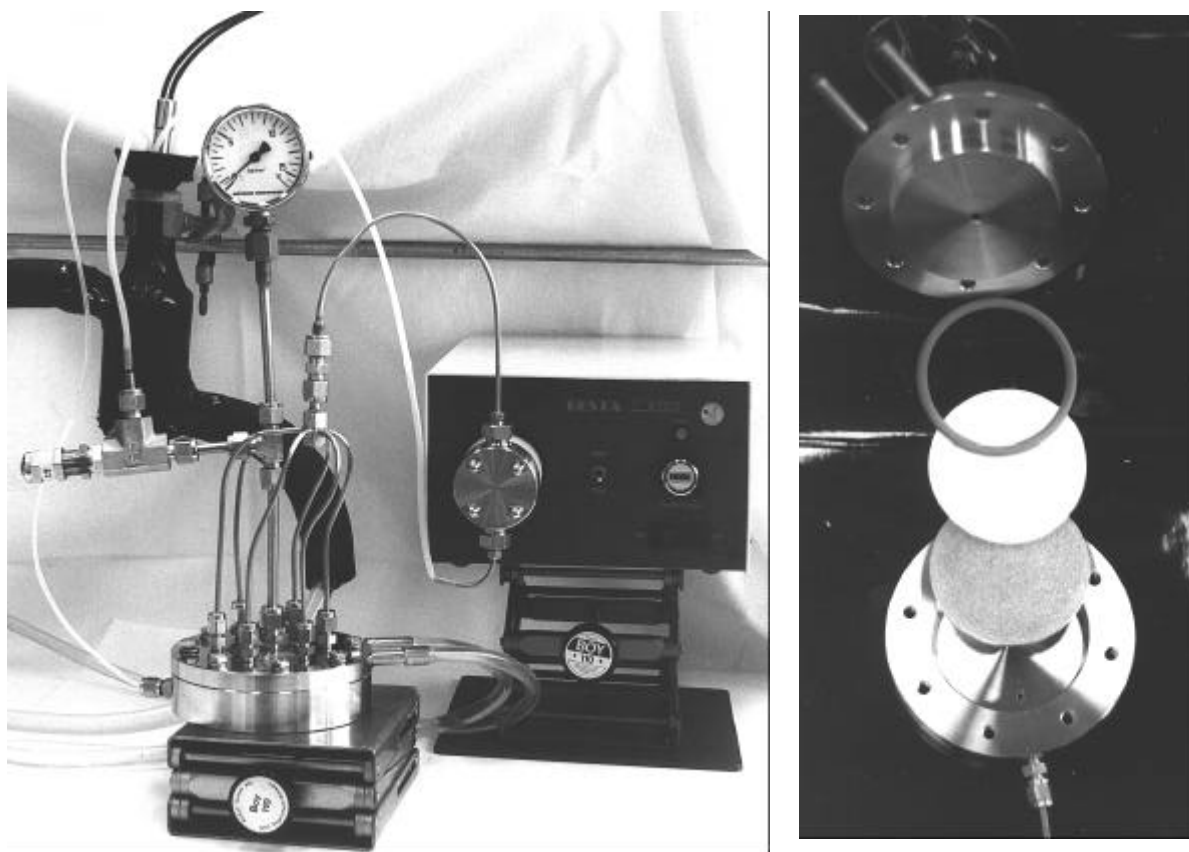


Abbildung 7.3: Photographie der verwendeten Filtrationsapparatur (links) und der Cross-Flow Filtrationszelle (Flußrichtung von außen nach innen). Die Zelle besteht aus (von unten): Zellenboden mit Permeatauslauf, Stützscheibe aus Sinteredelstahl, Membran, Dichtungsring, temperierter Deckel mit Feed und Retentat

Für die Schliffe durch die Membranen wurden Abschnitte dieser in ein Epoxidharz eingebettet und nach der Aushärtung mit dem Schleif- und Polierautomat Phoenix 4000 am Fraunhofer Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration Berlin abgeschliffen.

Die REM-Aufnahmen wurden durch das Institut für Elektronenmikroskopie (ZELMI) an der TU-Berlin angefertigt. Die Membranen wurden hierfür mit ca. 50 nm Gold besputtert. Es handelt sich um Streuelektronenaufnahmen.

AFM-Aufnahmen von Ultrafiltrationsmembranen wurden am Fachgebiet „Physik von Makromolekülen“ der Humboldt Universität Berlin von Dipl. Phys. J. Barner im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jürgen P. Rabe im Rahmen der SFB 448 –Kooperation mit dem Teilprojekt B5 „Molekulare Ordnung auf mesoskopisch strukturierten Festkörperoberflächen“ angefertigt.

Um die kommerziell erhältlichen Membranen auf hydrophobe Lösemittel zu konditionieren, wurden sie vor den Messungen mit Ölen oder Mikroemulsionen mit folgenden Lösungen gespült:

1 l	dest. Wasser (zum Entfernen der von den Herstellern zugesetzten Konservierungsstoffe)
50ml	Wasser / Aceton (Verhältnis 2:1)
50ml	Wasser / Aceton (Verhältnis 1:1)
50ml	Wasser / Aceton (Verhältnis 1:2)
100ml	Aceton (davon ca. 50ml zum Spülen der Rohre und Apparateile)
50ml	Öl / Aceton (Verhältnis 1:2)
50ml	Öl / Aceton (Verhältnis 1:1)
50ml	Öl / Aceton (Verhältnis 2:1)
50ml	Öl / Aceton (Verhältnis 9:1)
200-300ml	Öl (davon ca. 50ml zum Spülen der Rohre und Apparateile)

Die Rohre und die Filtrationszelle werden anschließend durch Druckluft (2 bar ca. 10 sek.) geleert.

Für die Versuche wurden vorrangig asymmetrische Membranen der BM Serie der Fa. Berghof/Eningen verwendet. Die BM100 und BM200 bestehen aus aromatischem Polyamid, welches auf eine poröse Polyethylenfolie aufgebracht ist. Sie weisen nach Herstellerangaben eine enge Trenngrenze bei 10000 (BM100) bzw. 20000 Dalton (BM200) auf. Des Weiteren wurde die YM3 Membran (Trenngrenze 3000 D) aus Zellulose der Fa. Amicon sowie die Nadir UF-PA-5H (Trenngrenze 5000D) aus Polyaramid der Fa. Hoechst getestet.

Die Verwendung von Aceton, Ethanol oder Isopropanol zur Konditionierung der Membranen hat auf deren Material großen Einfluß. Bei dem Wechsel von Aceton / Wasser- Gemischen zu Aceton / Öl können sich die Poren irreversibel schließen. Die Amiconmembran YM3 und die Berghofmembran BFM 3705 zeigten ein solches Verhalten, während die Berghofmembranen (BM100, BM200) und die Hoechstmembran (Nadir) die Prozedur unbeschadet überstanden. Die aggressiven Lösemittel quellen nicht nur das oft aus Polyethylen bestehende Stützvlies auf, sondern lassen auch die Struktur der asymmetrischen Membranen für die Zeit der Konditionierung zusammenbrechen. Die Membran schrumpft zusammen und regeneriert ihre ursprüngliche Struktur erst nach der vollständigen Umkonditionierung wieder.

Säulenchromatographie des Permeats

Da im Permeat von Mikroemulsionsfiltrationen immer das monomer gelöste Tensid (çuc) vorliegt, wurde eine säulenchromatographische Methode entwickelt, welche die çuc vom Öl und darin enthaltenem Produkt abtrennt. Hierfür wird das aufkonzentrierte Permeat (Cyclohexan abrotieren) in einer mit Kieselgel 60 gefüllten Säule (30 cm Säulenhöhe) gegeben. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus MTBE und „Petrolether 30-60°C“ (1 + 9) verwendet. Die hydrophoben Reaktanden (2-Heptanon, 2-Heptanol, Menthol und Propionsäurementhylester) werden durch die stationäre Phase nur wenig zurückgehalten und können somit vom Tensid abgetrennt werden. Das Tensid, welches sich über nahezu die gesamte Säule verteilt, da die hydrophoben Anteile weniger zurückgehalten werden, kann anschließend von der Säule durch hydrophile Lösemittel (MTBE) heruntergewaschen werden.

Untersuchungen des Phasenverhaltens

Die Trübungspunkte, bei denen eine Mikroemulsion durch Temperaturänderung in ein mehrphasiges System übergeht, wurden visuell bei einer Temperaturgenauigkeit von 0,2°C registriert.

Numerische Bestimmung des ADH / FDH – Verhältnisses

Zur Berechnung des ADH / FDH Verhältnisses wurden die Maple-Software verwendet. Auf der Basis der gemessenen, kinetischen Daten wurde die Produktbildungsgeschwindigkeit definiert, anschließend die Konzentrationen und Michaelis-Menten-Konstanten der Umsetzung definiert und nach der Definition der Desaktivierungskinetiken durch verschiedene Ausgabeformen das optimale Verhältnis von FDH zu ADH ermittelt. Durch ein optimales Verhältnis wird durch die ADH nur soviel NADH oxidiert, wie durch die Cofactorregenerierung nachgebildet wird. Ein typischer Programmablauf (mit Werten) zur Reduktion in Mikroemulsion folgt nach der Abkürzungserklärung:

ADH - Konzentration = ke1

FDH - Konzentration = ke2

NAD⁺ - Konzentration = cn

NADH - Konzentration = cnh

Keton - Konzentration = chk

Alle Konzentrationen c in µmol/l, Enzyme in mg/l; k sind Michaelis-Menten-Konstanten, ki sind Inhibitor konstanten.

Maple - Programm:

```
> restart;
> d1:=Diff(cnh(t),t)=ke2*fdh(t)*((cn-cnh(t))/((cn-cnh(t))+kn*(1+cnh(t)/ki1)))*(cf/(cf+kf))-
(ke1*adh(t)*((chk)/((chk+(khk*(1+cha(t)/ki2)))*(cnh(t)/(cnh(t)+(knh*(1+cn/ki3))))));
> chk:=30000;
> cn:=400;
> cf:=200000;
> kn:=88;
> kf:=61000;
> khk:=7120;
> knh:=750;
> ke1:=0.333*60;
> ke2:=2.1*60;
> ki1:=35;
> ki2:=300000;
> ki3:=300000;
> adh0:=1.5;
> fdh0:=0.53;
> fdh(t):=fdh0*exp(-0.000021181*t*60);
> d4:=Diff(cha(t),t)=(ke1*adh(t)*((chk)/((chk+(khk*(1+cha(t)/ki2)))*(cnh(t)/(cnh(t)+knh)))));
> ini:=cnh(0)=200,cha(0)=0;
> adh(t):=adh0*exp(-0.0017*60*t);
> lsg1:=dsolve({d1,d4,ini},{cnh(t),cha(t)}, type=numeric);
> with(plots):
> l1:=odeplot(lsg1,[t,cnh(t)],0..50,color=black,numpoints=1000);
> l2:=odeplot(lsg1,[t,cha(t)],0..50,color=black,numpoints=1000);
> display(l1,l2);
> l4:=odeplot(lsg1,[t,100*adh(t)/1.5],0..30,color=black);
> l5:=odeplot(lsg1,[t,100*fdh(t)/0.53],0..30,color=black);
> display(l4,l5);
```

Darstellung des rac. Propionsäurementhylesters:

0,1 mol/l rac. Menthol in Cyclohexan und 0,11 mol/l Propionsäureanhydrid in Cyclohexan werden über Nacht unter Rückflußkühlung erhitzt. Anschließend wird überflüssige Propionsäure, Cyclohexan und Propionsäureanhydrid unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Reaktionsprodukt (Ausbeute 100 %) kann ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

Ermittlung der kin. Daten der CRL-katalysierten Veresterung von Propionsäureanhydrid mit Menthol

Für die enantioselektive Veresterung wurden folgende Konzentrationen in einer Mikroemulsion (Marlipal O13-60 (abgetoppt) / Cyclohexan / Wasser mit $w_1 = 5$ $\gamma = 0,15$) bei 25°C und pH 8 (25 mM Puffer) eingestellt und der Umsatz der Reaktion nach 30 min durch GC ermittelt:

Tabelle 7.5: Konzentrationen für die Veresterung von Menthol

Lösungs Nr	DL-Menthol mmol/l	Prop.Anhyd. mmol/l
1	10	150
2	30	150
3	60	150
4	100	150
5	150	10
6	150	30
7	150	60
8	150	100

Darstellung von rac. 2-Oktanol oder 2-Heptanol als Standard für die GC

2-Oktanon (10mM) und KBH_4 (50mM) werden über Nacht bei Raumtemperatur in Wasser gerührt. Das Reaktionsprodukt (Ausbeute ca. 50 %) und nicht umgesetztes 2-Oktanon werden in Cyclohexan aufgenommen.

Darstellung von Membranen aus Poly (vinylalkohol)

Die in dieser Arbeit dargestellten PVA-Membranen wurden aus einer wäßrigen Polymerlösung gewonnen. Hierzu wurde eine 5 %ige PVA–Wassermischung für wenige Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Falle von Verunreinigungen oder nichtlöslichen PVA–Resten wurden diese abdekantiert.

Physikalisch vernetzte PVA-Membranen

Eine definierte Menge der wäßrigen Polymerlösung wurde zu einem ca. 1 mm dicken Film auf ein Filterpapier, das sich in einer Petrischale befand, gegossen. Dabei ist vor allem ein blasenfreies und gleichmäßiges Verteilen der Polymerlösung zu beachten. Die Petrischale wurde undicht verschlossen (einfacher Deckel) und auf einem Schleudertisch (ca. 20 sec bei 1500 bis 2000 U/min) nichthaftende PVA–Lösung entfernt, so daß ein dünner, gleichmäßiger Film zurückblieb. Das nun PVA getränkte Filterpapier wurde anschließend gewogen, um die Masse der Polymerlösung zu ermitteln und so Rückschlüsse auf die Membrandicke zu gewinnen (76 mm Durchmesser, Filterpapier = 0,38 g). Die physikalische Vernetzung erfolgte durch Einfrieren bei -20°C für mind. 1h und Auftauen bei 0°C für 30 min. Dieser Einfrier-Auftau-Zyklus wurde 3 bis 5 mal wiederholt.

Chemisch-physikalisch vernetzte PVA-Membranen

Die chemisch-physikalisch vernetzten PVA-Membranen wurden durch eine kombinierte Vernetzungsreaktion mit Glutardialdehyd und einen einmaligen Einfrier-Auftau-Zyklus dargestellt. Die Polymerlösung wurde mit Glutardialdehyd (auf 1 g 5 %ige PVA-Lösung 4,5 µl 25 %ige GDA) zusammengegeben, diese Lösung wurde gut vermischt und anschließend auf ein vorher mit 1 % Salzsäure getränktes Filterpapier zu einem ca. 1 mm dicken Film gegossen. Anschließend wurde analog zu den physikalisch Vernetzten Membranen mittels des Schleudertisches überflüssige PVA-Lösung entfernt und die Membran ausgewogen. Danach wurde die Membran durch einmaliges Einfrieren auf -20°C (ca. 1 h) und anschließendes Auftauen auf Raumtemperatur physikalisch vernetzt.

Reaktivmembran: Enzym – Membran - Verbund

Die Enzymimmobilisierung wurde durch gleichzeitiges Vernetzen von Enzym und Polymer (entrapment), durch Adsorption an die vernetzte Membran und durch kovalente Anbindung bewerkstelligt:

Adsorption: Das Enzym wurde zusammen mit der Membran und ca. 10 ml 10 mM pH-Phosphatpufferlösung für 1 h auf einen Schütteltisch gegeben (Schütteltisch „ST5 - CAT“ der Fa. M. Zipperer GmbH).

Einschluß: Das in wenig Wasser (50 – 100 µl pH 8 Pufferlösung) gelöste Enzym wurde vor der Vernetzungsreaktion mit der PVA-Lösung vermengt. Die Lösung wurde anschließend gleichmäßig und sehr dünn (so daß die Strukturen des Filterpapiers weiterhin mit dem Auge erkennbar waren) auf einem Filterpapier verteilt. Der Schleudertisch wurde nicht verwendet.

Kovalente Anbindung: Das Enzym wurde zunächst auf eine chemisch – physikalisch vernetzte Membran adsorbiert. Das Enzym wurde hierzu zusammen mit der Membran und ca. 10ml 10mM pH-Phosphatpufferlösung für 1 h auf einen Schütteltisch gegeben. Die Membran wurde anschließend mit wenig Wasser (ca. 2 mal 10 ml) gewaschen. Auf dem Schütteltisch wurde das Enzym kovalent an die Membran mit 100 µl 25 % GDA in 10 ml Wasser gebunden (ca. 1 h). Die Membran wurde erneut mit Wasser und anschließend für 30 min mit 1 % BSA-Lösung (um mögliche GDA-Reste zu neutralisieren) gewaschen und konnte verwendet werden.

Zufällige bireaktande Reaktion:

S1 und S2 müssen gleichzeitig mit dem Enzym gebunden sein, um Produkt zu bilden:

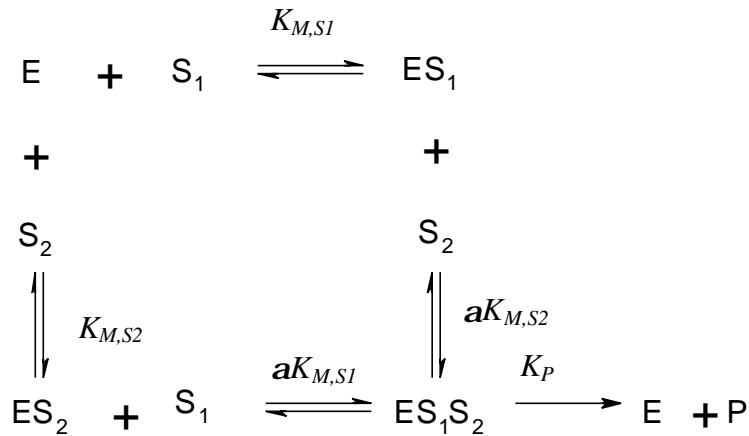


Abb.: 7.4: Reaktionsschema der zufällig bireaktanden Reaktion

Mit den Michelis-Menten Konstanten:

$$K_{M,S_1} = \frac{[E][S_1]}{[ES_1]} \quad ? \quad [ES_1] = \frac{[S_1]}{K_{M,S_1}}[E] \quad (a)$$

$$K_{M,S_2} = \frac{[E][S_2]}{[ES_2]} \quad ? \quad [ES_2] = \frac{[S_2]}{K_{M,S_2}}[E] \quad (b)$$

$$aK_{M,S_1} = \frac{[ES_2][S_1]}{[ES_1S_2]} \quad ? \quad [ES_1S_2] = \frac{[S_1]}{aK_{M,S_1}}[ES_2] = \frac{[S_1][S_2]}{aK_{M,S_1}K_{M,S_2}}[E] \quad (c)$$

$$aK_{M,S_2} = \frac{[ES_1][S_2]}{[ES_1S_2]} \quad ? \quad [ES_1S_2] = \frac{[S_2]}{aK_{M,S_2}}[ES_1] = \frac{[S_1][S_2]}{aK_{M,S_1}K_{M,S_2}}[E] \quad (d)$$

Grundgleichungen:

$$r = K_P[ES_1S_2] \quad (e)$$

$$[E]_t = [E] + [ES_1] + [ES_2] + [ES_1S_2] \quad (f)$$

$$r_{\max} = K_P[E]_t \quad (g)$$

Gl. (e) geteilt durch Gl. (f) und Einsetzen von Gl. (a-d) und Gl.(g) ergibt:

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{\frac{[S_1][S_2]}{aK_{M,S_1}K_{M,S_2}}}{1 + \frac{[S_1]}{K_{M,S_1}} + \frac{[S_2]}{K_{M,S_2}} + \frac{[S_1][S_2]}{aK_{M,S_1}K_{M,S_2}}} \quad (h)$$

unter der Bedingung, daß $\alpha = 1$ ist, ergibt sich nach dem Umformen:

$$r = r_{\max} \cdot \frac{[S_1]}{K_{M,S_1} + [S_1]} \cdot \frac{[S_2]}{K_{M,S_2} + [S_2]} \quad (\text{i})$$

8 Literatur

- Adachi, M., Shibata, K., Shioi, A., Harada, M., Katoh, S. 1998.** Selective Sparation of Trypsin from Pancreatin Using Bioaffinity in Reverse Micellar System Composed of a Nonionic Surfactant. *Biotechnol. Bioeng.* **58(6)**, 649-653
- Adachi, M., Yamazaki, M., Harada, M., Shioi, A., Katch, S. 1997.** Bioaffinity Sparation of Trypsin Using Trypsin Inhibitor Immobilized in Reverse Micelles Composed of a Nonionic Surfactant. *Biotechnol. Bioeng.* **53(4)**, 406-408
- Alekseiva, P., Petricheva, E., Konstantinov, H. 1998.** Enhancement of acid proteinase production by the fungus *Humicola lutea* 120-5 immobilized in crosslinked poly (vinyl alcohol) mixed with poly (ethylene glycol). *Process Biochemistry* **33(7)**, 725-728
- Almeida, F.C.L., Valente, A.P., Chaimovich, H. 1998.** Stability and Activity Modulation of Chymotrypsins in AOT Reverse Micelles by Protein-Interface Interaction. *Biotechnol. Bioeng.* **59(3)**, 360-363
- Andersson, M., Holmberg, H., Adlercreutz, P. 1998.** Evaluation of *Alcaligenes eutrophus* Cells as an NADH Regenerating Catalyst in Organic-Aqueous Two-Phase System. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 79-86
- Angelis, Y.S., Smonou, I. 1998.** Enantioselectivity and Diastereoselectivity in the Hydrolysis of Acyals and Structurally Related Esters of Secondary Alcohols with *Candida Rugosa* Lipase. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2823-2826
- Ayala, G.A., Kamat, S., Beckman, E.J., Russel, A.J. 1991.** Protein Extraction and Activity in Reverse Micelles of a Nonionic Detergent. *Biotechnol. Bioeng.* **39(8)**, 806-814
- Backlund, S., Eriksson, F., Kanerva, L.T., Rantala, M. 1995.** Selective enzymatic reactions using microemulsion based gels. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **4**, 121-127
- Backlund, S., Eriksson, F., Hedström, G., Laine, A., Rantala, M. 1996.** Lipase – catalized enantioselective esterifications using different microemulsion-based gels. *Colloid Polym. Sci.* **274**, 540-547
- Balcao, V.M., Vieira, M.C., Malcata, F.X. 1996.** Adsorption of Proteins from Several Commercial Lipase; Preparations onto a Hollow Fiber Membrane Module. *Biotechnol. Prog.* **12**, 164-172
- Basile, A., Drioli, E., Santella, F., Violante, V., Capannelli G., Vitulli G. 1996.** A study on catalytic membrane reactors for water gas shift reaction. *Gas Separation & Purification* **10**, 53-61
- Benjamin, S., Pandey, A. 1998.** *Candida Rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast* **14**, 1069-1087
- Benjamin, S., Pandey, A. 1997.** Enhancement of lipase production during repeated batch culture using immobilized *Candida Rugosa*. *Process Biochem.* **32(5)**, 437-440
- Benzonana, G., Esposito, S. 1971.** On the positional chain specificities of *Candida* *Cylindracea* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 15 - 22
- Beyer, A., Mähr, U., Schomäcker, R., Reichert, K.-H. 1999.** Reaktivmembran; Verfahren zur Herstellung und Verwendung einer Reaktivmembran. *Patentanmeldung* P199 18 486.0

- Biselli, M., Kragl, U., Wandrey, C. 1995.** Reaction Engineering for Enzyme-Catalized Biotransformations; Kap. A4 in Drauz, K., Waldmann, H. (Editor) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH-Weinheim (u.a.)
- Bode, G., Lade, M., Schomäcker, R. 1999.** Kinetik einer Phenolalkylierung in Mikroemulsionen mit Exzeßphasen. *Chem. Ing. Tech.* **71(8)**, 877-881
- Bolt, H.M., Degen, G.H. 2000.** Hormoneffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt. *Chemie in unserer Zeit* **34(1)**, 30-37
- Bönitz, M., Kula, M.-R. 1999.** CPCR – Ein vielseitig einsetzbarer Biokatalysator für stereoselektive Reduktionen. *Posterbeitrag auf der Dechema Jahrestagung 27.-29.4.1999*, Wiesbaden
- Bornscheuer, U.T. 1998.** Gerichtete Evolution von Enzymen. *Angew. Chem.* **110(22)**, 3285-3288
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. 1999.** *Hydrolases in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Weinheim
- Bowen, W.R., Williams, P.M. 1996 (a).** Dynamic Ultrafiltration Model for Proteins: A Colloidal Interaction Approach. *Biotechnol. Bioeng.* **50(2)**, 125-135
- Bowen, W.R., Mongruel, A., Williams, P.M. 1996 (b).** Prediction of the Rate of Cross-Flow Membrane Ultrafiltration: A Colloidal Interaction Approach. *Chem. Eng. Sci.* **51(18)**, 4321-4333
- Boy M., Voss H. 1996.** Reaktionstechnik der Biokatalyse in mikrostrukturierten Mehrphasensystemen. *Chem. Ing. Tech.* **68(7)**, 831-835
- Boy M., Voss H. 1998.** Biocatalysis in microstructured lyotropic liquid crystals. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **5**, 355-359
- Brannon, M.L., Peppas, N.A. 1987.** Solute Diffusion in Swollen Membranes. Part VIII. Characterization of and Diffusion in Asymmetric Membranes. *J. Mebr. Sci.* **32**, 125-138
- Breslow, R., Dong, S.D. 1998.** Biomimetic Reactions Catalized by Cyclodextrins and their Derivates. *Chem. Rev.* **98(5)**, 1997-2011
- Buchholz, K., Kasche, V. 1997.** *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Burk, M.J., Gross, M.F., Harper, T.G.P., Kalberg, C.S., Lee, J.R., Martinez, J.P. 1996.** Asymmetric Catalytic Routes to Chiral Building Blocks of Medicinal Interest. *Pure Appl. Chem.* **68**, 37-44
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Pinheiro, H., Prazeres, D.M.F. 1997.** Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. *J. Biotechnol.* **59**, 133-143
- Cambou, B., Klibanov, A.M. 1984.** Comparison of Different Strategies for the Lipase-Catalized Preparative Resolution of Racemic Acids and Alcohols: Asymmetric Hydrolysis, Esterification, and Transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1449-1454
- Carvalho, C.M.L., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. 1999.** Cutinase stability in AOT reversed micelles: system optimization using the factorial design methodology. *Enz. Microbial. Technol.* **24**, 569-576
- Celia, E.C., Cernia, E., D'Acquarica, I., Palocci, C., Soro, S. 1999.** High yield and optical purity in biocatalized acylation of trans-2-phenyl-1-cyclohexanol with *Candida Rugosa* lipase in non-conventional media. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **6**, 495-503

- Chang, C.-S., Tsai, S.-W. 1999 (a).** Lipase-catalized dynamic resolution of naproxen thioester by thiotransesterification in isooctane. *Biochem. Eng. J.* **3**, 239-242
- Chang, C.-S., Tsai, S.-W., Kuo, J. 1999 (b).** Lipase-catalized dynamic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester by Hydrolysis in isooctane. *Biotechnol. Bioeng.* **64(1)**, 120-126
- Chang, C.-S., Tsai, S.-W., Lin, C.-N. 1998.** Enzymatic resolution of (RS)-2-arylpropionic acid thioesters by *Candida Rugosa* lipase-catalized thiotransesterification or hydrolysis in organic solvents. *Tetrahedron Asym.* **9**, 2799-2807
- Chase, H.A., Yang, Y. 1998.** Immobilization of enzymes on poly (vinyl alcohol) – coated perfluorocarbon supports: comparison of techniques for the immobilization of trypsin and α -amylase on poly (vinyl alcohol)-coated solid and liquid perfluorocarbons. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 205-216
- Chen, D.-W., Chen, H.-H., Huang, T.-C. 1995.** Desactivation Kinetics of Yeast Alcohol Dehydrogenase in Aerosol OT / Isooctane Reverse Micelles. *J. Chem. Eng. Jap.* **28(5)**, 551-555
- Chew, C.H., Li, T.D., Gan, L.H., Quek, C.H., Gan, L.M. 1998.** Bicontinuous-Nanostructured Polymeric Materials from Microemulsion Polymerization. *Langmuir* **14**, 6068-6076
- Chong, R., Jelen, P., Wong, W. 1985.** The Effect of Cleaning Agents on a Noncellulosic Ultrafiltration Membrane. *Sep. Sci. Technol.* **20(5&6)**, 393-402
- Cicek, H., Tuncel, A. 1998.** Immobilization of α -Chymotrypsin in Thermally Reversible Isopropylacrylamide-Hydroxyethylmethacrylate Copolymer Gel. *J. Polym. Sci. A: Polymer Chem.* **36**, 543-552
- Clackson, T., Wells, J.A. 1994.** In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol.* **12**, 173-184
- Clair N.S., Wang, Y.-F., Margolin, A.L. 2000** Cofactor – Bound Cross – Linked Enzyme Crystals (CLEC) of Alcohol Dehydrogenase. *Angew. Chem.* **112(2)**, 388-391
- Co, C.C., Kaler, E.W. 1998.** Particle Size and Monomer Partitioning in Microemulsion Polymerization. 2. Online Small Angle Neutron Scattering Studies. *Macromolecules* **31**, 3203-3210
- Collet, A. 1998.** Racematspaltung: Sagten Sie "klassisch"? *Angew. Chem.* **110(23)**, 3429-3431
- Corey, E.J., Bakshi, K.R., Shibata, S. 1987.** Highly Enantioselective Borane Reduction of Ketones Catalyzed by Chiral Oxazaborolidines. Mechanism and Synthetic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5551-5553
- Costa, V.E.U., Alifantes, J., Martins, J.E.D. 1998.** Evaluation of lipase from *Candida Rugosa* in the resolution of endo-(+)-1,8,9,10,11,11-hexachloropentacyclo-[6.2.1.1^{3,6}.0^{2,7}.0^{5,9}]-dodecan-4-alcohol. *Tetrahedron Asym.* **9**, 2579-2585
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R.J., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreghi, A.N., Gupta, A.K. 1994.** A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3180-3186
- Dai, L., Klibanov, A.M. 1999.** Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9475-9478
- Das, N., Prabhakar, P., Kayastha, A.M. 1997.** Enzyme Entrapped Inside Reverse Micelle in the Fabrication of a New Urea Sensor. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 329-332

- De Jesus, P.C., Rezende, M.C., Nascimento, M.G. 1995.** Enzymatic Resolution of Alcohols via Lipases Immobilized in Microemulsion based Gels. *Tetrahedron Asymmetry* **6(1)**, 63-66
- Diczfalussy, M.A., Hellman, U., Alexson, E.H. 1997.** Isolation of Carboxylester Lipase (CEL) Isoenzymes from *Candida rugosa* and Identification of the corresponding Genes. *Archives Biochem. Biophys.* **348(1)**, 1-8
- Doig, S.D., Boam, A.T., Livingston, A.G., Stuckey, D.C. 1998.** A Membrane Bioreactor for Biotransformations of Hydrophobic Molecules, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 587-594
- Doig, S.D., Boam, A.T., Livingston, A.G., Stuckey, D.C. 1999.** Epoxidation of 1,7-octadiene by *Pseudomonas oleovorans* in a membrane bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 601-611
- Doretto, L., Ferrara, D., Gattolin, P., Lora, S. 1997.** Amperometric biosensor with physically immobilized glucose oxidase on a PVA cryogel membrane. *Talanta* **44**, 859-866
- Dorowska-Taran, V.N., Veeger, C., Visser, J.W.G. 1993.** Comparison of the dynamic structure of a – chymotrypsin in aqueous solution and in reverse micelles by fluorescent active-site probing. *Eur. J. Biochem.* **211**, 47-55
- Fadnavis, N.W., Koteswar, K. 1999.** An Unusual Reversible Sol-Gel Transition Phenomenon in Organogels and Its Application for Enzyme Immobilisation in Gelatin Membranes. *Biotechnol. Prog.* **15**, 98-104
- Famiglietti, M., Hochköppler, A., Wehrli, E., Luisi, P.L. 1992.** Photosynthetic Activity of Cyanobacteria in Water-in-Oil Microemulsions. *Biotechnol. Bioeng.* **40(1)**, 173-178
- Fendler, J.H. 1987.** Atomic and Molecular Clusters in Membrane Mimetic Chemistry. *Chem. Rev.* **87**, 877-899
- Fernandez-Velasko, D.A., Rodriguez, R., Vargas, S., de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. 1998.** Reverse Micelle Systems Composed of Water, Triton X100 and Phospholipids in Organic Solvents. 2. Catalysis and Thermostability of Hexokinase. *J. Coll. Interface Sci.* **197**, 29-35
- Fletcher P.D.I., Freedman, R.B., Robinson, B.H., Rees, G.D., Schomäcker, R. 1987 a.** Lipase-catalyzed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. *Biochim. Biophys. Acta.* **912**, 278-282
- Fletcher, P.D.I., Howe, A.M., Robinson, B.H. 1987 b.** The Kinetics of Solubilisation Exchange between Water Droplets of a Water-in-oil Microemulsion. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **83**, 985-1006
- Fletcher P.D.I., Parrot, D. 1989.** Protein-partitioning between water-in-oil microemulsions and conjugate aqueous phases. In "Structure and Reactivity in reverse micelles" (M.P. Pileni, Ed.), Elsevier Amsterdam, 303-319
- Freeman, K.S., Lee, S.S., Kiserow, D.J., McGrown, L.B. 1998.** Increased Chymotrypsin Activity in AOT / Bile Salt Reverse Micelles. *J. Coll. Interface Sci.* **207**, 344-348
- Furusaki, S. 1988.** Engineering Aspects of Immobilized Biocatalysts. *J. Chem. Eng. Japan* **21(3)**, 219-230
- Garcia-Alles, L.F., Gotor, V. 1998.** Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Media: Solvent Effects on Equilibrium and Individual Rate Constants. *Biotechnol. Bioeng.* **59(6)**, 684-694

- Giffels, G., Beliczey, J., Felder, M., Kragl, U. 1998.** Polymer enlarged oxazaborolidine in a membrane reactor: enhancing effectivity by retention of homogenous catalyst. *Tetrahedron Asym.* **9**, 691-696
- Giorno, L., Drioli, E. 1997 a.** Catalytic Behaviour of Lipase Free and Immobilized in Biphasic Membrane Reactor with Different Low Water-Soluble Substrates. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 11-14
- Giorno, L., Molinari, R., Drioli, E., Bianchi, D., Cesti, P. 1995.** Performance of a Biphasic Organic/Aqueous Hollow Fibre Reactor Using Immobilized Lipase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **64**, 345-352
- Giorno, L., Molinari, R., Natoli, M., Drioli, E. 1997 b.** Hydrolysis and regioselective transesterification catalized by immobilized lipase in membrane bioreactors. *J. Memb. Sci.* **125**, 177-187
- Gitlesen, T., Bauer, M., Adlercreutz, A. 1997.** Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim. Biophys. Acta* **1345**, 188-196
- Giver, L. 1997.** Protein Design by Directed Evolution. IBC's 2nd Annual International Conference on "Biological Approches and Novel Applications for Molecular Nanotechnology" 8.-9.12.1997 LaJolla, Californien USA
- Golman, B., Shinohara, K., Kobayashi, M.I. 1997.** Selectivity and yield of exothermic consecutive reactions in catalytically active porous membrane reactor. *J. Chem. Eng. Japan* **30**, 507-512
- Gonzales-Navarro, H., Braco, L. 1998.** Lipase-Enhanced Activity in Flavour Ester Reactions by Trapping Enzyme Conformers in the Presence of Interfaces. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 122-127
- Grätz, K., Helmstedt, M., Meyer, H.W., Quitzsch, K. 1998.** Structure and phase behaviour of the ternary system water, n-heptane and the nonionic surfactant Igepal CA520. *Coll. Polym. Sci.* **276**, 131-137
- Griebenow, K., Klibanov, A.M. 1996.** On Protein Denaturation in Aqueous-Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **118(47)**, 11695-11700
- Griffin, D.R., Yang, F., Carta, G., Gainer, J.L. 1998.** Asymetric Reduction of Acetophenon with Calcium-Alginate-Entrapped Baker's Yeast in Organic Solvents. *Biotechnol. Prog.* **14**, 588-593
- Grochulski, P., Yunge, L., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Gupta, A.K., Cygler, M. 1993.** Insights into Interfacial Activation from Open an Structure of *Candida Rugosa* Lipase. *J. Biol. Chem.* **268(17)**, 12843-12847
- Hagen, A.J., Hatton, T.A., Wang, D.I.C. 1990.** a) Protein Refolding in Reverse Micelles. b) Protein Refolding in Reverse Micelles: Interactions of the Protein with Micelle Components. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 955-975
- Hakoda, M., Enomoto, A., Hoshino, T., Shiragami, N. 1996 a.** Electro-Ultrafiltration Bioreactor for Enzymatic Reaction in Reverse Micelles. *J. Ferm. Bioeng.* **82(4)**, 361-365
- Hakoda, M., Nakamura, K., Enomoto, A., Hoshino, T. 1996 b.** Electro-Ultrafiltration Reverse Micelles containing Enzymes. *J. Chem. Eng. Japan* **29(2)**, 300-306
- Han, D., Rhee, J.S. 1986.** Characteristics of Lipase-Catalized Hydrolysis of Olive Oil in AOT-Isooctan Reverse Micelles. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1250-1255

- Happel, J. 1958.** Viscous Flow in Multiparticle Systems: Slow Motion of Fluids Relative to Beds of Spherical Particles. *Aiche J.* **4**(2), 197-201
- Hartmeier, W. 1985.** Anwendung immobilisierter Biokatalysatoren. *Chem. Ind.* **37**,321-323
- Hartmeier, W. 1994.** Hefeimmobilisierung - vom Labor zur industriellen Nutzung. *BioEngineering* **6**, 6-12
- Hashimoto, Y., Ono, T., Goto, M., Hatton, T.A. 1998.** Protein Refolding by Reverse Micelles Utilizing Solid-Liquid Extraction Technique. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 620-623
- Hayes, D.G. 1997.** Mechanism of Protein Extraction from the Solid State by Water-in-Oil Microemulsions. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 583-593
- Hayes, D.G., Gulari, E. 1990.** Esterification Reactions of Lipase in Reverse Micelles. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 793-801
- Hicke, H.-G., Becker, M., Malsch, G., Ulbricht, M. 1998.** Covalent enzyme immobilization in different porous polymer membranes. In Ballesteros, A., Plou, F.J. Iborra, J.L., Halling, P.J. (Editors) Progress in Biotechnology "Stability and Stabilization of Biocatalysts" Elsevier Amsterdam, 661-666
- Hicke, H.-G., Böhme, P., Becker, M., Schulze, H., Ulbricht, M. 1996.** Immobilization of Enzymes onto Modified Polyacrylonitrile Membranes: Application of the Acyl Azide Method. *J. Appl. Polym. Sci.* **60**, 1147-1161
- Hilhorst, R., Laane, C., Veeger, C. 1983.** Enzymatic conversion of apolar compounds in organic media using a NADH-regenerating system and dihydrogen as reductant. *FEBS Letters* **159**(12), 225-228
- Hodges, A.M., Linton, M., Mau, A. W.-H., Cavell, K.J., Hey, J.A., Seen, A.J. 1990.** Perfluorinated membranes as catalyst supports. *Appl. Organometallic Chem.* **4**, 465-473
- Holmberg, K. 1994.** Organic and Bioorganic Reactions in Microemulsions. *Adv. J. Coll. Int. Sci.* **51**, 137-174
- Holmberg, K. 1997.** Microemulsions in Biotechnology. In Solans, C., Kunieda, H. (Ed.) "Industrial Applications of Microemulsions". Marcel Dekker, NY - USA , 69-95
- Huang, S.Y., Chang, H.L., Goto, M. 1998.** Preparation of surfactant-coated lipase for the esterification of geraniol and acetic acid in organic solvents. *Enz. Microbial. Technol.* **22**, 552-557
- Iskandar, L., Ono, T., Kamiya, N., Goto, M., Nakashio, F., Furusaki, S. 1998.** Catalytic properties of novel reversed micellar system on trans-esterification by α – chymotrypsin in organic media. *Biochem. Eng. J.* **2**, 29-33
- Janssen, A.E.M., Sijnsnes, B.J., Vakurov, A.V., Hallig, P.J. 1999.** Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. *Enz. Microbial. Technol.* **24**, 463-470
- Jianhe, X., Kawamoto, T., Tanaka, A., Ying, H. 1998.** Comparison of Acid Anhydrides with Carboxylic Acid in Enantioselective Enzymatic Esterification of Racemic Menthol. *Chinese J. Biochem.* **13**(4), 263-269
- Jenta, T. R.-J., Batts, G., Rees, G.D., Robinson, B.H. 1997.** Kinetic Studies of *Chromobacterium viscosum* Lipase in AOT Water in Oil Microemulsions and Gelatin Microemulsion-Based Organogels. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 416-427

- Jönsson, A.S., Jönsson, B. 1991.** The influence of nonionic and ionic surfactants on hydrophobic and hydrophilic ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* **56**, 49-76
- Jönsson, A.S., Jönsson, B. 1996.** Ultrafiltration of Colloidal Dispersions - A Theoretical Model of the Concentration Polarization Phenomena. *J. Colloid Interf. Sci.* **180**, 504-518
- Johnston, K.P., Harrison, K.L., Clarke, M.J., Howdle, S.M., Heitz, M.P., Bright, F.V., Carlier, C., Randolph, T.W. 1996.** Water-in-Carbon Dioxide Microemulsions: An Environment for Hydrophiles Including Proteins. *Science* **271**, 624-626
- Kahlweit, M., Strey, R. 1985.** Phasenverhalten ternärer Systeme des Typs H₂O – Öl – nichtionisches Amphiphil(Mikroemulsionen). *Angew. Chem.* **97**, 655-669
- Kahlweit, M. 1995.** How to prepare Microemulsions at prescribed temperature, oil and brine. *J. Phys. Chem.* **99**, 1281-1284
- Kalaf, N., Govardhan, P.C., Lalonde, J.J., Persichetti, R.A., Wang, Y-F., Margolin, A.L. 1996.** Cross-linked Enzyme Crystals as Highly Active Catalysts in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5494-5495
- Kamiya, N., Goto, M. 1997.** How Is Enzymatic Selectivity of Menthol Esterification Catalyzed by Surfactant Coated Lipase Determined in Organic Media? *Biotechnol. Prog.* **13**, 448-492
- Kamiya, N., Kasagi, H., Inoue, M., Kusunoki, K., Goto, M. 1999.** Enantioselective Recognition Mechanism of Secondary Alcohol by Surfactant Coated Lipase in Nonaqueous Media. *Biotechnol. Bioeng.* **65**(2), 227-232
- Kanada, T., Miyata, N., Fukui, T., Kawamoto, T., Tanaka, A. 1998.** Doubly entrapped baker's yeast survives during long-term stereoselective reduction of ethyl-3-oxobutanoate in an organic solvent. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **49**, 377-381
- Ke, T., Klibanov, A.M. 1998.** On Enzymatic Activity in Organic Solvents as a Function of Enzyme History. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 746-750
- KFA-Jülich, Degussa (Anmelder) 1998.** Verfahren zur katalytischen, enantioselektiven Reduktion von Ketonen. *Deutsches Patent* DE 19647892A
- Kinoshita, K., Yagi, M., Kaneko, M. 1999.** Activity analysis of mononuclear ruthenium ammine complex dispersed in a polymer membrane as an electrochemical water oxidation catalyst, *J. Mol. Cat. A: Chemical* **142**, 1-5
- Király, Z., Börner, R. H. K., Findenegg, G. H. 1997.** Adsorption and Aggregation of C8E4 and C8G1 Nonionic Surfactants on Hydrophilic Silica Studied by Calorimetry, *Langmuir* **13**, 3308-3315
- Király, Z., Findenegg, G. H., 1998.** Calorimetric Evidence of the Formation of Half-Cylindrical Aggregates of a Cationic Surfactant at the Graphite/ Water Interface. *J. Phys. Chem.* **102**, 1203-1211
- Klibanov, A.M. 1986.** Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech* **16**, 354-359
- Knezevic, Z.D., Siler-Marinkovic, S.S., Mojovic, L.V. 1998.** Kinetic of lipase-catalized hydrolysis of palm oil in lecetin / isooctane reverse micelles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 267-271
- Kobayashi, M., Ando, I., Ishii, T., Amiya, S. 1998.** Structural and dynamical studies of poly(vinyl alcohol) gels by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *J. Mol. Structure* **440**, 155-164

- Komives, C.F., Lilley, E., Russel, A.J. 1994 a.** Biodegradation of Pesticides in Nonionic Water-in-Oil Microemulsions of Tween 85: Relationship Between Micelle Structure and Activity. *Biotechnol. Bioeng.* **43(10)**, 946-959
- Komives, C.F., Osborne, D.E., Russel, A.J. 1994 b.** Characterization of a Nonionic Surfactant Reverse Micellar System for Enzyme Catalysis. *J. Phys. Chem.* **98(1)**, 369-376
- Kragl, U. 1996 a.** Immobilized Enzymes and Membrane Reactor, pp.274-283. In: T. Godfrey, S. West (eds.), *Industrial Enzymology*, 2nd edition. Macmillan Press Ltd., London
- Kragl U., Kruse W., Hummel W., Wandrey C. 1996 b.** Enzyme Engineering Aspects of Biocatalysis: Cofactor Regeneration as Example. *Biotechnol. Bioeng.* **52(2)**, 309-319
- Kragl, U., Niedermeyer, U., Kula, M.-R., Wandrey, C. 1990.** Engineering aspects of enzyme engineering - Continuous asymmetric C-C-bond formation in an enzyme-membrane-reactor. *Enzyme Engineering 10, Annals of the New York Academy of Science* **613**, 167-175
- Kragl, U., Wandrey, C. 1997.** Biocatalytic Reactions with Immobilized Enzymes. in "Handbook of Heterogeneous Catalysis" Vol. 5 (Ertl, G., Knözinger, H., Weitkamp, J. eds.). VCH-Weinheim
- Kroutil, W., Faber, K. 1998.** Deracemization of compounds possessing a sec-alcohol or -amino group through a cyclic oxidation-reduction sequence: a kinetic treatment. *Tetrahedron Asymmetry* **9**, 2901-2913
- Kruse, W., Hummel, W., Kragl, U. 1996.** Alcohol-dehydrogenase-catalysed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **115**, 239-243
- Kula, M.-R., Peters, J. 1996.** Ketoester reductase for conversion of keto acid esters to optically active hydroxy acid esters. *US-Patent* US5523223
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. 1987.** Rules for Optimisation of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87
- Laane, C., Tramper, J., Lilly, M.D. (eds.) 1987 b.** *Biocatalysis in Organic Media; Proceedings of an International Symposium held at Wageningen, The Netherlands, 7-12. December 1986* Elsevier, Amsterdam.
- Lade, M. 2000.** Charakterisierung von Mikroemulsion aus technischen nichtionischen Tensiden. *Dissertation* an der TU-Berlin
- Lade, M., Mays, H., Schmidt, J., Willumeit, R., Schomäcker, R. 2000.** On the nanoparticle synthesis in microemulsions: detailed characterization of an applied reaction mixture. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **163**, 3-15
- Lalonde, J. 1997.** Enzyme Catalysis: Cleaner, Safer, Energy Efficient. *Chem. Eng.* **9**, 108-112
- Larsson, K.M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1987.** Study of horse liver alcoholdehydrogenase (HLADH) in AOT-cyclohexane reverse micelles. In Laane, C., Tramper, J., Lilly, M.D. (eds.) *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam. 355-360
- Larsson, K.M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., Olsson, U. 1990.** Enzymatic Catalysis in Microemulsion: Enzyme Reuse and Product Recovery. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 135-141.
- Lee, K.M., Biellmann, J.-F. 1987.** Enzyme and organic solvents: horse liver alcohol dehydrogenase in non-ionic microemulsion: Stability and activity. *FEBS Letter* **223(1)**, 33-36

- Lee, S.S., Kiserow, D.J., McGown, L.B. 1997.** Enzyme Solubilisation in a Reverse Micellar Microreactor with a Bile Salt Cosurfactant. *J. Coll. Interface Sci.* **193**, 32-40
- Lee, K.K.B., Poppenburg, L.H., Stuckey, D.C. 1998 a.** Terpene ester production in a solvent phase using reverse micelle-encapsulated lipase. *Enz. Microbial Technol.* **23**, 253-260
- Lee, H.-J., Chang, G.-G. 1998 b.** A Kinetic Analysis of the Endogenous Lactate Dehydrogenase Activity of Duck Lens e-Crystallin in Reverse Micelles. *J. Coll. Interface Sci.* **201**, 26-33
- Levashov, A.V., Khmelnitsky, Y.L., Klyachko, N.L., Chernyak V.Y., Martinek K. 1982.** Enzymes Entrapped into Reverse Micelles in Organic Solvents: Sedimentation Analysis of Protein - Aerosol OT – H₂O – Octane System. *J. Coll. Interface Sci.* **88(2)**, 444-457
- Li, B., Niu, L., Kou, W., Deng, Q., Cheng, G., Dong, S. 1998.** Synthesis of a Self-Gelatinizable Grafting Copolymer of Poly (vinyl Alcohol) for Construction of an Amperometric Peroxidase Electrode. *Analytical Biochem.* **256**, 130-132
- Li, R.H., Barbari, T.A. 1995.** Performance of poly (vinyl alcohol) thin-gel composite ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* **105**, 71-78
- Liese A. 1998 a.** Reaktorkonzepte für Biotransformationen in Zweiphasensystemen. *Dissertation.* Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Liese A., Karutz M., Kamphuis J., Wandrey C., Kragl U. 1996.** Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: Overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnol. Bioeng.* **51(5)**, 544-550
- Liese, A., Zelinski, T., Kula, M.-R., Kierkels, H., Karutz, M., Kragl, U., Wandrey, C. 1998 b.** A novel reactor concept of poorly soluble ketones. *J. Mol. Cat. B.: Enzymatic* **4**, 91-99
- Lilly, M.D. 1997.** The development of biochemical engineering science in Europe. *J. Biotechnol.* **59**, 11-18
- Lin, S.-S., Miyawaki, O., Nakamura, K. 1997.** Continuous Production of L-Alanine with NADH Regeneration by a Nanofiltration Membrane Reactor. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61(12)**, 2029-2033
- Lineweaver, H., Burk, D. 1936.** The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-667
- Luethi, P., Luisi, P.L. 1984.** Enzymatic Synthesis of Hydrocarbon-Soluble Peptides with Reverse Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 7285-7286
- Lüdtke, K., Peinemann, K.-V., Kasche, V., Behling, R.-D. 1998.** Nitrate removal of drinking water by means of catalytically active membranes. *J. Membr. Sci.* **151**, 3-11
- Luisi, P.L. 1985.** Enzyme als Gastmoleküle in inversen Micellen. *Angew. Chem.* **97**, 449-460 (Angew. Chem. Int. Ed. 1985, **24**, 439-450)
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H. 1988.** Reverse micelles as host for proteins and small molecules. *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 209-246
- Macris, J.B., Stamatis, H., Kolisis, F.N. 1996.** Microemulsions as a tool for the regioselective lipase-catalyzed esterification of aliphatic alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 521-523

- Malakhova, E.A., Kurganov, B.I., Levashov, A.V., Berezin, I.V., Martinek, K. 1983.** A new approach to the study of enzymatic reactions with the participation of water-insoluble substrates. Pancreatic lipase enclosed in inverted micelles of a surface active substance in an organic solvent. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **270**, 182-185 (russ.: S.472)
- Manoj, K.M., Swaminathan, T. 1997.** Ester hydrolysis in reverse micelles using lipase. *Bioproc. Eng.* **17**, 185-188
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmelnitski, Y.L., Berezin, I.V. 1986.** Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.* **155**, 453-468
- Metzger, J.O. 1998.** Lösungsmittelfreie organische Synthesen. *Angew. Chem.* **110(21)**, 3145-3148
- Michaelis, L., Menten, M.L. 1913.** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Zeitschrift* **49**, 333-369
- Michor, H., Marr, R., Gamse, T., Schilling, T., Klingsbichel, E., Schwab, H. 1996.** Enzymatic catalysis in supercritical carbon dioxide: comparison of different lipases and a novel esterase. *Biotechnol. Letters* **18(1)**, 79 - 84
- Michor, H., Gamse, T., Marr, R. 1997.** Enzymkatalyse in überkritischen Kohlendioxid: Racemattrennung von D,L Menthol. *Cem. Ing. Tech.* **69**, 690-694
- Millqvist-Fureby, A., Gill, I.S., Vulfson, E.N. 1998 a.** Enzymatic Transformations in Supersaturated Substrate Solutions: 1. A General Study with Glycosidases. *Biotechnol. Bioeng.* **60(2)**, 190-196
- Millqvist-Fureby, A., MacManus, D.A., Davies, S., Vulfson, E.N. 1998 b.** Enzymatic Transformations in Supersaturated Substrate Solutions: 2. Synthesis of Disaccharides via Transglycosylation. *Biotechnol. Bioeng.* **60(2)**, 197-203
- Mitchell, J., Ninham, B.W. 1981.** Micelles, vesicles and microemulsions. *J. Chem. Soc. Faraday Transactions* **77**, 601-629
- Mojovic, L., Knezevic, Z., Popadic, R., Jovanovic, S. 1998.** Immobilization of Lipase from *Candida Rugosa* on a polymer support. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 676-681
- Morgan, J.D., Kaler, E.W. 1998.** Particle Size and Monomer Partitioning in Microemulsion Polymerization. 1. Calculation of the Particle Size Distribution. *Macromolecules* **31**, 3197-3202
- Mori, Y., Tokura, H., Yoshikawa, M. 1997.** Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous polyvinyl alcohol solutions and their applications. *J. Mat. Sci.* **32**, 491-496
- Moulik, S.P., Paul, B.K. 1998.** Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **78**, 99-195
- Mulder, H., Wassink, G.R., Breure, A.M., van Andel, J.G. Rulkens, W.H. 1998.** Effect of Nonionic Surfactant on Naphthalene Dissolution and Biodegradation. *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 397-407
- Mulder, M. 1990.** Basic principles of membrane technology. Dordrecht Niederlande: Kluwer Academic Publishers
- Na, L., Zhongzhou, L., Shuguang, X. 2000.** Dynamically formed poly (vinyl alcohol) ultrafiltration membranes with good anti-fouling characteristics. *J. Membr. Sci.* **169**, 17-28

- Nagayama, K., Karaiwa, K., Doi, T., Imai, M. 1998.** Esterification activity and stability of *Candida Rugosa* lipase in AOT microemulsion based organogels. *Biochem. Eng. J.* **2**, 121-126
- Nakamura, K., Hakado, M. 1995.** Ultrafiltration of Reverse Micelles Containing Enzymes. *J. Chem. Eng. Japan* **28**(1), 14-18
- Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. 1988.** Stereochemical Control on Yeast Reduction of α -Keto Esters. Reduction by Immobilized Baker's Yeast in Hexane. *J. Org. Chem.* **53**, 2589-2593
- Neuman, R.D., Ibrahim, T.H. 1999.** Novel Structural Model of Reverse Micelles: The Open Water- Channel Model. *Langmuir* **15**, 10-12
- Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D., Kulbe, K.D. 1996.** Continuous Enzymatic Production of Xylitol with Simultaneous Coenzyme Regeneration in a Charged Membrane Reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **52**(3), 387-396
- Obon, J.M., Manjon, A., Iborra, J.L. 1998.** Retention and Regeneration of Native NAD(H) in Noncharged Ultrafiltration Membrane Reactors: Application to L-Lactate and Gluconate Production. *Biotechnol. Bioeng.* **57**(5), 510-517
- Oh, S.-G., Holmberg, K., Ninham, B.W. 1996.** Effect of Hydrocarbon Chain Length on Yield of Lipase Catalyzed Triglycerid Synthesis in Microemulsion. *J. Coll. Interface Sci.* **181**, 341-343
- Okamoto, T., Ueji, S. 1999.** Drastic enhancement of the lipase-catalyzed esterification in organic solvents by addition of metal ions. *Chem. Commun.* **9**, 939-940
- Oldfield, C. 1994.** Enzymes in Water-in-oil Microemulsions ("Reverse Micelles"): Principles and Applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **12**, 255-327
- Orlich, B., Schomäcker, R. 1999 a.** Die Ultrafiltration von w/o - Mikroemulsionen in der Biokatalyse; *Chem. Ing. Tech.* **71**(1&2), 156-159
- Orlich, B., Schomäcker, R. 1999 b.** Enzymatic reduction of a less water-soluble ketone in reverse micelles with NADH regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* **65**(3), 357-362
- Orlich, B., Kempin, E., Reichert, K.-H., Schomäcker, R. 1999 c.** Verfahren zur Herstellung einer Reaktivmembran; *Patentanmeldung* P199 43 728.9
- Papadimitriou, V., Xenakis, A., Cazanias, C.T., Kolisis, F.N. 1997.** Structural and catalytic aspects of cutinase in w/o – microemulsions. *Colloid Polym. Sci.* **275**, 609-616
- Pasteur, L. 1848.** Recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique, et le sens du pouvoir rotatoire. *Acad. Sci. S.401 und Ann. Chim. Phys.* **24**, 442
- Paul, D. 1998.** Polymermembranen für die Stofftrennung. *Chemie in unserer Zeit*, **32**(4), 179-205
- Pepin, P., Lortie, R. 1999.** Influence of Water Activity on the Enantioselective Esterification of (R,S)-Ibuprofen by *Candida antarctica* Lipase B in Solventless Media. *Biotechnol. Bioeng.* **63**(4), 502-505
- Pereira, R.S. 1998.** The use of Baker's Yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. *Critical Rev. Biotechnol.* **18**(1), 25-83

- Perez-Gilabert, M., Bru, R. Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. 1998.** Hydroperoxidase activity of soybean lipogenase in reverse micelles. *J. Biotechnol.* **60**, 137-140
- Persichetti, R.A., Lalonde, J.J., Govardhan, C.P., Khalaf, N.K., Margolin, A.L. 1996.** *Candida Rugosa* Lipase: Enantioselectivity Enhancement in Organic Solvent. *Tetrahedron Letters* **37**(36), 6507-6510
- Perutz, M. F. 1978.** Electrostatic Effects in Proteins. *Science* **201**, 1187-1191
- Peters, J., Zelinski, T., Minuth, T., Kula, M.-R. 1993.** Synthetic Applications Of The Carbonyl Reductases Isolated From *Candida parapsilosis* And *Rhodococcus erythropolis*. *Tetrahedron Asym.* **4**(7), 1683-1692
- Pfüller, U. 1986.** Mizellen-Vesikel-Mikroemulsionen; Springer Berlin-Heidelberg-New York
- Prabhu, K., Radhakrishnan, R., Oyama, S.T. 1999.** Supported nickel catalysts for carbon dioxide reforming of methane in plug flow and membrane reactors. *Appl. Catalysis A: General* **183**, 241-252
- Prazeres, D.M.F., Garcia, F.A.P., Cabral, J.M.S. 1994.** Continuous lipolysis in a reverse micellar membrane bioreactor. *Bioprocess Eng.* **10**, 21-27
- Prüsse, U., Hörold, S., Vorlop, K.-D. 1997.** Verkapselung mikroskopischer Katalysatoren in Gelförmigen Polymernetzwerken. *Chem. Ing. Tech.* **69**(1&2), 100-103
- Ramakrishnan, V.R., Darszon, A., Montall, M. 1983.** A Small Angle X-ray Scattering Study of a Rhodopsin-Lipid Complex in Hexane. *J. Biol. Chem.* **258**(8), 4857-4860
- Reetz, M.T., Becker, M.H., Kühling, K.M., Holzwart, A. 1998.** Zeitaufgelöste IR-thermographische Detektion und Screening von enantioselektiven katalytischen Reaktionen. *Angew. Chem.* **110**(19), 2792-2795
- Reetz, M.T., Zonta, A., Simpelkamp, J. 1995.** Effiziente heterogene Biokatalysen durch den Einschluß von Lipasen in hydrophoben Sol-Gel-Materialien. *Angew. Chem.* **107**(3), 373-376
- Rice, K.E., Watkins, J., Hill (Jr.), C.G. 1999.** Hydrolysis of Menhade Oil by *Candida cylindracea* Lipase in a Hollow Fiber Reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 33-45
- Rissom, S. 1999 a.** Membranverfahren für Redoxenzyme - Gasversorgung - Reaktion - Produktextraktion. Dissertation. Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Rissom, S., Beliczey, J., Giffels, G., Kragl, U., Wandrey, C. 1999 b.** Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalyzed process. *Tetrahedron Asym.* **10**, 923-928
- Rodakiewicz-Nowak, J., Maslakiewicz, P., Haber, J. 1996.** The effect of linoic acid on pH inside sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate reverse micelles in isooctane and on the enzymatic activity of soybean lipogenase. *Eur. J. Biochem.* **238**, 549-553
- Rodriguez, R., Vargas, S., Fernandez-Velasko, D.A. 1998.** Reverse Micelle Systems Composed of Water, Triton X100 and Phospholipids in Organic Solvents. 1. Phase Boundary Titrations and Dynamic Light Scattering Analysis. *J. Coll. Interface Sci.* **197**, 21-28
- Ruckenstein, E., Karpe, P. 1990.** Enhanced Enzymatic Activity in Reverse Micelles. *Biotechnol. Let.* **12**(4), 241-246

- Rudolph, R., Zettlmeissl, G., Jaenicke, R. 1979.** Reconstruction of Lactic Dehydrogenase. Noncovalent Aggregation vs. Reactivation. 2. Reactivation of Irreversibly Denatured Aggregates. *Biochemistry* **18**, 5572-5575
- Russel, A.J., Komives, C. 1994.** May the (centrifugal) force be with you ! (A novel centrifugal reactor system is used with reverse micelles enzyme catalysis to biodegrade organophosphates). *Chemtech* **1**, 26-32
- Samara, J.-P., Lee, K.M., Biellmann, J.-F. 1987.** Enzymes and microemulsions: Activity and kinetic properties of liver alcohol dehydrogenase in ionic water-in-oil-microemulsions. *Eur. J. Biochem.* **163**, 609-617
- Schmidt, J., Guesdon, C., Schomäcker, R. 1999.** Engineering aspects of preparation of nanocrystalline particles in microemulsions. *J. Nanopart. Res.* **1**, 267-276
- Schmidt-Steffen, A., Staude, E. 1992.** Ultrafiltration Membranes for Chemical Bonding of Urease. *Biotechnol. Bioeng.* **39(7)**, 725-731
- Schneider, J., Gründig, B., Renneberg, R., Cammann, K., Madaras, M.B., Buck, R.P., Vorlop, K.-D. 1996.** Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing. *Anal. Chim. Acta* **325**, 161-167
- Schomäcker, R. 1991.** Chemical Reactions in Microemulsions: Probing the Local Dielectric Number of the Dispersed Water. *J. Phy. Chem.* **95(1)**, 451-457
- Schomäcker, R., Braun, G. 1996.** Continuous Ultrafiltration of Reverse Micelles in the Ternary System AOT / Isooctane / Water. *Langmuir* **12(10)**, 2362-2366
- Schomäcker, R., Orlich, B., Braun, G. 1997.** Continuous Ultrafiltration of Reverse Micelles in the Ternary System Igepal CA520 / Cyclohexane / Water. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **101**, 1695-1698
- Schomäcker, R., Robinson, B.H., Fletcher, P.D.I. 1988.** Interactions of Enzymes with Surfactants in Aqueous Solutions and in Water-in-Oil-Microemulsions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **84(12)**, 4203-4212
- Schubert, K.-V., Kaler, E.W. 1996.** Nonionic Microemulsions. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100(3)**, 190-205
- Schwuger, M.-J., Stickdorn, K., Schomäcker, R. 1995.** Microemulsions in Technical Processes. *Chem. Rev.* **95(4)**, 894-864
- Seelbach, K., Kragl, U. 1997.** Nanofiltration membranes for cofactor retention in continuous enzymatic synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 389-392
- Seoud, O.A.E. 1989.** Effect of organized surfactant assemblies on acid-base equilibria. *Adv. Colloid Interface Sci.* **30**, 1-30
- Sepracor, Inc. (Anmelder) 1989.** Multiphase asymmetric membrane reactor systems. *US Patent* US 4795704
- Sepracor, Inc. (Anmelder) 1991.** Methodes for membrane reactor resolution of stereoisomers. *US Patent* US 5077217
- Servi, S. 1990.** Baker's Yeast as Reagent in Organic Synthesis. *Synthesis* **1**, 1-25
- Shu, J., Grandjean, B.P.A., Kaliaguine, S., Ciavarella, P., Giroir-Fendler, A., Dalmon, J.-A. 1997.** Gas permeation and isobutane dehydrogenation over very thin Pd/ceramic membranes, *Can. J. Chem. Eng.* **75**, 712-720

- Sjöblom, J., Lindberg, R., Friberg, S.E. 1996.** Microemulsions - phase equilibria characterization, structure, applications and chemical reactions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **95**, 125-287
- Skrika-Alexopoulos, E., Muir, J., Freedman, R.B. 1993.** Stability of Bilirubin Oxidase in Organic Solvent Media: A Comparative Study on Two Low-Water Systems. *Biotechnol. Bioeng.* **41(9)**, 894-899
- Snijder-Lambers, A.M., Vulfson, E.N., Doddema, H.J. 1991.** Optimization of alcohol dehydrogenase activity and NAD(H) regeneration in organic solvents. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **119** 226-230
- Srinivas, R., Panda, T. 1999.** Enhancing the feasibility of many biotechnological processes through enzyme deactivation studies. *Bioprocess Eng.* **21**, 363-369
- Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F.N. 1999.** Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnol. Adv.* **17**; 293-318
- Strauss, U.T., Felfer, U., Faber, K. 1999.** Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. *Tetrahedron Asym.* **10**, 107-117
- Takasago Perfumery Co. Ltd. (Anmelder) 1988.** Process of preparing optically active alcohol. *Europäische Patente* EP 0295890, EP 0297752, EP 0295109
- Takahashi, K. 1998.** Organic Reactions Mediated by Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **98(5)**, 2013-2033
- Tamura, K., Schelly, Z.A. 1979.** Reverse Micelles of Aerosol-OT in Benzene (Part 1). *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 7643-7644
- Tamura, K., Schelly, Z.A. 1981.** Reverse Micelles of Aerosol-OT in Benzene (Part 2 & 3). *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1013-1022
- Therisod, M., Klibanov, A.M. 1996.** Facile Enzymatic Preparation of Monoacylated Sugars in Pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5638-5640
- Therisod, M., Klibanov, A.M. 1997.** Regioselective Acylation of Secondary Hydroxyl Groups in Sugar Catalyzed by Lipase in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3977-3981
- Tischer, W., Wedekind, F. 1999.** Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Biocatalysis From Discovery to Application (Fessner W.-D. Ed.) in Topics in Current Chemistry* **200**, 95-126
- Tjandra, D., Lade, M., Wagner, O., Schomäcker, R. 1998.** The Kinetics of an Interfacial Reaction in a Microemulsion. *Chem. Eng. Technol.* **21(8)**, 666-670
- Turner, N.J. 1994.** Recent Advances in the Use of Enzyme-catalysed Reactions in Organic Solvents. *Natural Product Reports* **1**, 1-15
- Uhlich, T., Ulbricht, M., Tomaschewski, G. 1996.** Immobilization of enzymes in photochemically cross linked polyvinyl alcohol. *Enz. Microbial. Technol.* **19**, 124-131
- Ulbricht, M., Papra, M., 1997.** Polyacrylonitrile enzyme ultrafiltration membranes prepared by adsorption, cross-linking, and covalent binding. *Enz. Microbial. Technol.* **20**, 61-68
- Ulbricht, M., Riedel, M., 1998.** Ultrafiltration membrane surface with grafted polymer tentacles: preparation, characterization and application for covalent protein binding. *Biomaterials* **19**, 1229-1237

- Ulbricht, M., Riedel, M., Marx, U. 1996** Novel photochemical surface functionalization of polysulfone ultrafiltration membranes for covalent immobilization of biomolecules, *J. Membr. Sci.* **120**, 239-259
- Van Vyve, F., Renken, A. 1999.** Hydroformylation in reverse micellar systems. *Catalysis Today* **48**, 237-243
- Virkajärvi, I., Linko, M. 1999.** Immobilization: A Revolution in Traditional Brewing. *Naturwissenschaften* **86**, 112-122
- Viswanath, S., Wang, J., Bachas, L.G., Butterfield, D.A., Bhattacharyya, D. 1998.** Site-Directed and Random Immobilization of Subtilisin on Functionalized Membranes: Activity Determination in Aqueous and Organic Media. *Biotechnol. Bioeng.* **60(5)**, 608-616
- Waldburger, R.M., Widmer, F. 1996.** Membrane Reactors in Chemical Production Processes and the Application to the Pervaporation-Assisted Esterification. *Chem. Eng. Technol.* **19**, 117-126
- Watase, M., Nishinari, K. 1985.** Rheological and DSC Changes in Poly(vinyl alcohol) Gels Induced by Immersion in Water. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **23**, 1803-1811
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1953.** Molecular structure of nucleic acid: a structure for desoxiribonucleic acid. *Nature* **171**, 737-738
- Wijmans, J.G., Nakao, S., Smolders, C.A. 1984.** Flux Limitations in Ultrafiltration: Osmotic Pressure Model and Gel Layer Model. *J. Membr. Sci.* **20**, 115-124
- Wong, C.-H. 1989.** Enzymatic Catalysts in Organic Synthesis. *Science* **244**, 1145-1152
- Wu, W.-H., Akoh, C.C., Phillips, R.S. 1996.** Lipase-catalized stereoselective esterification of DL-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents. *Enz. Microbial Technol.* **18**, 536-539
- Xu, J.-H., Kawamoto, T., Tanaka, A. 1995 a.** Efficient kinetic resolution of dl-menthol by lipase-catalized enantioselective esterification with acetic anhydride in a feed batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 402 - 407
- Xu, J.-H., Kawamoto, T., Tanaka, A. 1995 b.** High-performance continuous operation for enantioselective esterification of menthol by use of acid anhydride and free lipase in organic solvent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 639-643
- Yamagiwa, K., Kobayashi, H., Ohkawa, A., Onodera, M. 1993.** Membrane Fouling in Ultrafiltration of Hydrophobic Nonionic Surfactant. *J. Chem. Eng. Japan* **26(1)**, 13-18
- Yang, F., Russel, A.L. 1994.** Two-Step Biocatalytic Conversion of an Ester to an Aldehyde in Reverse Micelles. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 232-241
- Yang, F., Russel, A.L. 1995.** A Comparison of Lipase-Catalized Ester Hydrolysis in Reverse Micelles, Organic Solvent, and Biphasic Systems. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 60-70
- Yang, F., Weber, T.W., Gainer, J.L., Carta, G. 1997.** Synthesis of Lovastatin with Immobilized *Candida Rugosa* Lipase in Organic Solvents: Effect of Reaction Conditions on Initial Rates. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 671-680
- Yasufuku, Y., Ueji, A.-i. 1997.** High Temperature-Induced High Enantioselectivity of Lipase for Esterifications of 2-Phenoxypropionic Acids in Organic Solvent. *Bioorg. Chem.* **25**, 88-99

- Zaks, A., Klibanov, A.M. 1988 a.** Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *J. Biol. Chem.* **263**(7), 3194-3201
- Zaks, A., Klibanov, A.M. 1988 b.** The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *J. Biol. Chem.* **263**(17), 8017-8021
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R., Jaenicke, R. 1979.** Reconstruction of Lactic Dehydrogenase. Noncovalent Aggregation vs. Reactivation. 1. Physical Properties and Kinetics of Aggregation. *Biochemistry* **18**, 5567-5571
- Zelinski, T., Waldmann, H. 1997.** Quervernetzte Enzymkristalle (CLECs) – effiziente und stabile Biokatalysatoren für die präoperative organische Chemie. *Angew. Chem.* **109**, 746-748
- Zhou, F., Kakisaka, K., Ishida, T., Iwai, Y., Arai, Y., Furuya, T. 1997.** Measurement and correlation of partition coefficients of amino acids in dextran + poly(ethyleneglycol) + water aqueous two phase systems. *J. Chem. Eng. Japan* **30**(2), 349-353
- Zuegg, J., Hönig, H., Schrag, J.D., Cygler, M. 1997.** Selectivity of Lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols. *J. Molec. Cat. B: Enzymatic* **3**, 83-98

Lebenslauf

Name : Orlich

Vorname : Bernhard

Geburtsdatum: 25. 4. 1969

Geburtsort: Berlin

Familienstand: ledig

Wohnort: Boddinstr. 10, 12053 Berlin

Ausbildung: 1975 - 1981 Grunewald-Grundschule, Berlin
1981 - 1988 Beethoven Gymnasium, Berlin
6. 6. 1988 Abitur
WS 88/89 Studium Chemie an der TU - Berlin
10. 7. 1992 Vordiplom
27. 2. 1997 Diplom (Dipl. – Ing.)

Tätigkeiten: 24. 2. - 8. 4.1994 und 1. 8. - 18. 9. 1994 Praktikum am
Central Pollution Control Board, Delhi, Indien

Feb. 1995 - Aug. 1997 Studentischer Hilfswissenschaftler bei
der Fraunhofer Gesellschaft, Institut für Zuverlässigkeit und
Mikrointegration

1.1. – 31.3.1997 Werksvertrag bei der Fraunhofer
Gesellschaft, Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration.
”Untersuchungen zur Metallisierbarkeit von Dielektrika”

1.4.1997 – 31.10.2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU –
Berlin, Institut für Technische Chemie, Arbeitskreis Prof.
Schomäcker; Mitarbeit in Forschung und Lehre